

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III  
(Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS GINGIVALES ASOCIADOS AL  
EMBARAZO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ana Carrillo de Albornoz Sainz**

Bajo la dirección del doctor  
Antonio Bascones Martín

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-9529-2**

**©Ana Carrillo de Albornoz Sainz, 2011**

# ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS GINGIVALES ASOCIADOS AL EMBARAZO



**Ana Carrillo de Albornoz Sainz**

Departamento de Periodoncia  
Director: Prof. Antonio Bascones



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Marzo de 2011.

# INDICE DE CONTENIDOS

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Definición</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Fisiología de la mujer</b>	<b>8</b>
1.2.1. Fisiología hormonal	8
<i>1.2.1.1 Hormonas hipotalámicas. Regulación neuroendocrina</i>	8
<i>1.2.1.2. Hormonas adenohipofisarias</i>	9
<i>1.2.1.3. Hormonas ováricas</i>	9
<i>1.2.1.4. Hormonas placentarias</i>	11
1.2.2. Fisiología femenina	12
<i>1.2.2.1. Pubertad</i>	12
<i>1.2.2.2. Ciclo menstrual</i>	12
<i>1.2.2.3. Ciclo ovárico</i>	13
<i>1.2.2.4. El embarazo</i>	14
<b>1.3. El periodonto: diana de hormonas sexuales esteroideas</b>	<b>15</b>
1.3.1. Hormonas sexuales: mecanismo de acción	15
1.3.2. Receptores hormonales en el periodonto	15
1.3.3. Efectos de los estrógenos en el periodonto	16
1.3.4. Efecto de la progesterona en el periodonto	17
<b>1.4. Gingivitis inducida por placa</b>	<b>18</b>
1.4.1. Factores involucrados en la modulación de la expresión clínica	18
<i>1.4.1.1. Factores locales</i>	18
<i>1.4.1.2. Factores sistémicos</i>	19
<b>1.5. Embarazo &amp; gingivitis: La gingivitis gestacional</b>	<b>22</b>
1.5.1. Antecedentes históricos	22
1.5.2. Prevalencia. Evolución durante el embarazo	22
1.5.3. Características clínicas	27
1.5.4. Distribución intraoral	29
1.5.5. Granuloma gravídico	30
1.5.6. Papel de la placa bacteriana	30
1.5.7. Relación del embarazo con la periodontitis	32
1.5.8. Papel de las hormonas sexuales en la inflamación gingival	34

1.5.9. Influencia del nivel socioeconómico	34
1.5.10. Otras variables involucradas en la inflamación gingival	35
1.5.11. Sesgos plausibles presentes en la literatura	35
<i>Anexo Índices de placa</i>	<i>37</i>
<i>Anexo Índices gingivales</i>	<i>40</i>
<b>6. Etiopatogenia de la gingivitis del embarazo</b>	<b>42</b>
1.6.1. Introducción	42
1.6.2. Cambios vasculares	43
1.6.3. Influencia hormonal sobre las células del periodonto	44
1.6.4. Cambios en el sistema inmunitario	45
1.6.4.1. Mediadores de la inflamación	46
1.6.5. Cambios en el biofilm subgingival	49
1.6.5.1. La placa bacteriana como biofilm	51
1.6.5.2. Patógenos periodontales	52
1.6.5.3. El biofilm subgingival en el embarazo	52
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>57</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>57</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>V. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>60</b>
5.1. Diseño experimental	61
5.2. Selección de pacientes	61
5.3. Cálculo del tamaño muestral	62
5.4. Plan de trabajo	62
5.5. Variables clínicas	63
5.6. Variables sociodemográficas	64
5.7. Análisis hormonal	64
5.8. Variables inmunológicas (IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ y PGE2)	67
5.8.1. Toma de muestras de fluido crevicular gingival	67
5.8.2. Calibración del Periotron.	67
5.8.3. Procedimientos de laboratorio.	68
5.9. Variables microbiológicas	69
5.9.1. Selección de localizaciones	69
5.9.2. Procedimientos de laboratorio para el cultivo de muestras	70
<b>VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>74</b>
Estudio I	74
Estudio II	75



Estudio III	76
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>78</b>
7.1. Población de estudio	79
7.2. Variables socio-demográficas	80
7.3. <i>Estudio I</i>	82
7.3.1. Resultados obtenidos durante embarazo y postparto	82
7.3.1.1. Variables clínicas	82
7.3.1.2. Variables hormonales	83
7.3.1.3. Variables inmunológicas (IL-1 $\beta$ y PGE2)	84
7.3.2. Comparativa del grupo embarazo con no embarazo	85
7.3.2.1. Variables clínicas	85
7.3.2.2. Variables hormonales	88
7.3.2.3. Variables inmunológicas (IL-1 $\beta$ y PGE2)	88
7.4. <i>Estudio II</i>	90
7.4.1. Resultados obtenidos durante embarazo y postparto	90
7.4.2. Comparativa del grupo embarazo con no embarazo	100
7.5. <i>Estudio III</i>	103
7.5.1. Índices clínicos localización-específicos	103
7.5.2. Variables inmunológicas (IL-6, TNF- $\alpha$ )	105
7.5.3. Análisis CHAID exhaustivo	107
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
8.1. Diseño del estudio	114
8.2. Limitaciones del estudio	115
8.3. Variables clínicas	116
8.4. Variables microbiológicas	117
8.5. Variables inmunológicas	121
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>126</b>

## PREFACIO

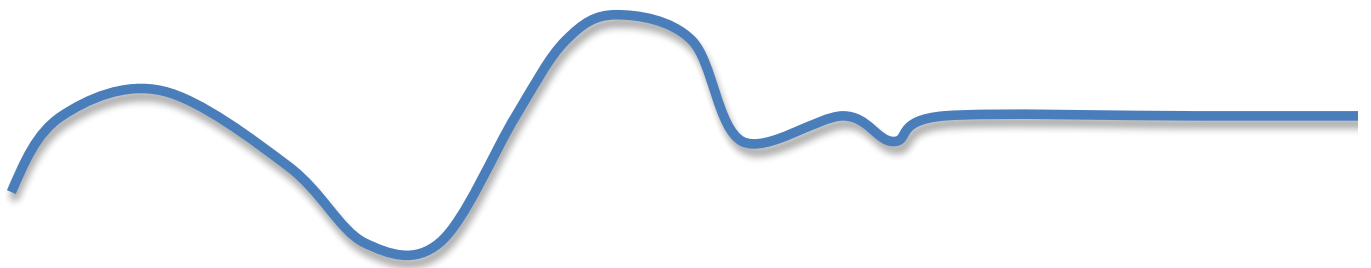
---

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes estudios (adjuntos en los anexos 3, 4 y 5):

- I.      Figuero, E., Carrillo-de-Albornoz, A., Herrera, D., Bascones-Martínez, M. (2010)  
Gingival changes during pregnancy:I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters. *J Clin Periodontol* 37, 220-229.
- II.     Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D., Bascones-Martínez, A. (2010)  
Gingival changes during pregnancy:II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* 37, 230-240.
- III.    Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D., Bascones-Martínez, A. (2011).  
Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation.  
*Aceptado para publicación en Journal of Clinical Periodontology.*

1

# INTRODUCCIÓN



# DEFINICIÓN

Gingivitis del embarazo o gestacional es el término empleado para describir la inflamación gingival que se desarrolla durante el embarazo. Se define como aquella inflamación gingival iniciada por placa y exacerbada por el incremento en los niveles de hormonas sexuales esteroideas característicos del embarazo (Mariotti, 1999). La influencia hormonal en el periodonto está recogida en la actual clasificación de enfermedades periodontales bajo la categoría de enfermedades gingivales iniciadas por placa y exacerbadas por el sistema endocrino, incluyendo gingivitis asociada a pubertad, menstruación y embarazo (Armitage, 1999)(Tabla 1).

<p>I. Gingival Diseases</p> <p>A. Dental plaque-induced gingival diseases*</p> <p>1. Gingivitis associated with dental plaque only</p> <p>a. without other local contributing factors</p> <p>b. with local contributing factors (See VIII A)</p> <p>2. Gingival diseases modified by systemic factors</p> <p>a. associated with the endocrine system</p> <p>1) puberty-associated gingivitis</p> <p>2) menstrual cycle-associated gingivitis</p> <p>3) pregnancy-associated</p> <p>a) gingivitis</p> <p>b) pyogenic granuloma</p> <p>4) diabetes mellitus-associated gingivitis</p> <p>b. associated with blood dyscrasias</p> <p>1) leukemia-associated gingivitis</p> <p>2) other</p> <p>3. Gingival diseases modified by medications</p> <p>a. drug-influenced gingival diseases</p> <p>1) drug-influenced gingival enlargements</p> <p>2) drug-influenced gingivitis</p> <p>a) oral contraceptive-associated gingivitis</p> <p>b) other</p> <p>4. Gingival diseases modified by malnutrition</p> <p>a. ascorbic acid-deficiency gingivitis</p> <p>b. other</p> <p>B. Non-plaque-induced gingival lesions</p> <p>1. Gingival diseases of specific bacterial origin</p> <p>a. <i>Neisseria gonorrhea</i>-associated lesions</p> <p>b. <i>Treponema pallidum</i>-associated lesions</p> <p>c. streptococcal species-associated lesions</p> <p>d. other</p> <p>2. Gingival diseases of viral origin</p> <p>a. herpesvirus infections</p> <p>1) primary herpetic gingivostomatitis</p> <p>2) recurrent oral herpes</p> <p>3) varicella-zoster infections</p> <p>b. other</p>	<p>3. Gingival diseases of fungal origin</p> <p>a. <i>Candida</i>-species infections</p> <p>1) generalized gingival candidosis</p> <p>b. linear gingival erythema</p> <p>c. histoplasmosis</p> <p>d. other</p> <p>4. Gingival lesions of genetic origin</p> <p>a. hereditary gingival fibromatosis</p> <p>b. other</p> <p>5. Gingival manifestations of systemic conditions</p> <p>a. mucocutaneous disorders</p> <p>1) lichen planus</p> <p>2) pemphigoid</p> <p>3) pemphigus vulgaris</p> <p>4) erythema multiforme</p> <p>5) lupus erythematosus</p> <p>6) drug-induced</p> <p>7) other</p> <p>b. allergic reactions</p> <p>1) dental restorative materials</p> <p>a) mercury</p> <p>b) nickel</p> <p>c) acrylic</p> <p>d) other</p> <p>2) reactions attributable to</p> <p>a) toothpastes/dentifrices</p> <p>b) mouthrinses/mouthwashes</p> <p>c) chewing gum additives</p> <p>d) foods and additives</p> <p>3) other</p> <p>6. Traumatic lesions (factitious, iatrogenic, accidental)</p> <p>a. chemical injury</p> <p>b. physical injury</p> <p>c. thermal injury</p> <p>7. Foreign body reactions</p> <p>8. Not otherwise specified (NOS)</p>
---	--

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades gingivales (Armitage 1999).

# FISIOLOGÍA DE LA MUJER

---

## I.2.1. FISIOLOGÍA HORMONAL

La homeostasis del periodonto está influida por complejas relaciones multifactoriales. Entre ellas, el sistema endocrino juega un papel destacable. Las hormonas regulan y modulan específicamente la reproducción, crecimiento, desarrollo y mantenimiento del medio interno, así como la producción de energía, utilización y almacenamiento de la misma.

En el sistema hormonal femenino pueden diferenciarse los siguientes grupos hormonales:

- Hormonas hipotalámicas.
- Hormonas adenohipofisarias/gonadótropas o gonadotropinas.
- Hormonas ováricas, secretadas por los ovarios en respuesta a las hormonas adenohipofisarias.
- Gonadotropina coriónica humana (hCG). Secretada por el corion, tejido fetal componente de la placenta.

### I.2.1.1. HORMONAS HIPOTALÁMICAS.

#### REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA FUNCIÓN OVÁRICA

El hipotálamo es una glándula endocrina situada bajo el tálamo, forma parte del diencefalo. Junto con la hipófisis, tiene una función homeostática que se regula a través de un sistema de retroalimentación negativa. Mantiene conexiones con el sistema nervioso central (SNC) mediante haces nerviosos, principalmente con los lóbulos frontal y temporal. Asimismo también mantiene conexiones con la hipófisis, tanto directas a través de fibras nerviosas como por medio del tallo hipofisario. El lóbulo anterior de la hipófisis no mantiene comunicación directa con el hipotálamo mediante fibras nerviosas, sino a través del sistema vascular portahipofisario.

Por su acción sobre la función gonadal, el hipotálamo destaca por la producción de la *hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)*, la cual regula la secreción hormonal de la hipófisis. En la hipófisis anterior, la GnRH estimula la producción y liberación tanto de hormona foliculoestimulante (FSH) como de hormona luteinizante (LH).

### **I.2.1.2. HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS**

Las gonadotropinas u hormonas gonadotropas son hormonas glucoproteicas producidas por el lóbulo anterior de la hipófisis. Controlan la producción de gametos y la función endocrina de las gónadas.

*Homana foliculoestimulante (FSH)*. Ejerce su acción sobre las células de la granulosa del ovario y estimula el crecimiento de las células germinales.

*Hormona luteinizante (LH)*. Actúa sobre las células intersticiales y estromales promoviendo la síntesis de hormonas sexuales esteroideas. Destaca por su papel en la inducción de la ovulación.

### **I.2.1.3. HORMONAS OVÁRICAS**

Las *hormonas sexuales* comprenden las hormonas producidas por el ovario o el testículo, y están implicadas en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y procesos reproductivos. El ovario desempeña su papel en la reproducción mediante dos funciones: secreción de hormonas y producción de ovocitos. Ambas funciones son realizadas por los folículos, los cuales constituyen la unidad funcional más importante del ovario.

Las hormonas sexuales pertenecen al subgrupo de lípidos denominados genéricamente esteroides, los cuales se caracterizan por presentar ciclopentanoperhidrofenantreno como estructura básica común, formado por tres anillos bencénicos (A, B, C), constituidos cada uno por 6 átomos de carbono y un anillo de ciclopentano (D) de 5 átomos de carbono. Se distinguen tres grandes grupos de esteroides sexuales: estrógenos, gestágenos y andrógenos.

#### ***Estrógenos***

Los estrógenos son hormonas esteroideas implicadas en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de la mujer, en la regulación del ciclo menstrual y de la ovulación, así como del embarazo. En las mujeres, los estrógenos son sintetizados en los ovarios y en la placenta durante la gestación. Durante la primera parte del embarazo, el cuerpo lúteo (que no se retrae como lo haría en un ciclo menstrual normal) produce estrógenos. Posteriormente, la placenta y la corteza adrenal del feto son responsables de mantener elevados los niveles de estrógenos en la sangre materna. Los estrógenos naturales comprenden la estrona, estradiol y estriol (Mariotti 1994).

- *Estradiol*. El *estradiol-17-beta* es el estrógeno más potente y el que segrega el ovario en mayor cantidad. También puede ser sintetizado por testículos, placenta y tejidos periféricos. La producción diaria varía según la fase del ciclo ovárico, oscilando de 30-50 mdg/día en la

fase folicular precoz, 300-500 mcg/día en la fase preovulatoria y 200-350 mcg/día en la fase lútea, lo cual implica concentraciones plasmáticas de 70-100 pg/ml en la fase folicular precoz, de 220-400 pg/ml preovulatoriamente y 150-250 pg/ml en la fase lútea.

- *Estrona*. También es secretada por el ovario en pequeñas cantidades, aunque la principal fuente proviene de la conversión extragonadal de androstendiona en tejidos periféricos.
- *Estriol*. Tanto el estradiol como la estrona se metabolizan principalmente a estriol, el estrógeno detectado con mayor frecuencia en orina. Su potencia biológica como estrógeno es muy baja, pero su producción es elevada en caso de embarazo.

Actividades biológicas de los estrógenos: (i) crecimiento y trofismo de los órganos genitales femeninos (caracteres sexuales primarios); (ii) desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios; (iii) crecimiento uterino; (iv) liberación pulsátil de LH por el SNC; (v) engrosamiento de la mucosa vaginal y (vi) desarrollo de conductos ductales mamarios.

Otras actividades: (i) actúan sobre glándulas endocrinas (tiroides y suprarrenal); (ii) mantenimiento del equilibrio del sistema simpático y parasimpático mediante acciones catecolaminérgicas en el SNC; (iii) intervienen en el equilibrio hidrosalino reteniendo sodio y agua, en el metabolismo del calcio y del fósforo (limitando la reabsorción ósea), en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico; (iv) actúan sobre la circulación y coagulación sanguínea y (v) mantienen el trofismo de la piel femenina.

### ***Gestágenos***

La *progesterona* es el principal de los gestágenos. Actúa de forma sinérgica con los estrógenos. Su principal fuente es el ovario (especialmente por el cuerpo lúteo) y la placenta, si bien también pueden sintetizarse en las glándulas adrenales y el hígado. La progesterona es en su mayoría transportada por proteínas plasmáticas. 5  $\alpha$ -dihidroprogesterona y desoxicorticosterona constituyen los metabolitos activos de la progesterona.

La progesterona es una hormona producida principalmente por las células del cuerpo lúteo del ovario, elevando así el nivel de progesterona durante la segunda mitad del ciclo menstrual. La función principal de la progesterona durante el embarazo es el mantenimiento del embarazo. Sobre el endometrio provoca una transformación secretora, pero sólo cuando ha sido previamente proliferado por los estrógenos, ya que se encargan de la inducción de receptores de progesterona. Otras funciones de la progesterona incluyen: (i) crecimiento y trofismo de la mama; (ii) acciones metabólicas (disminución de la secreción hepática de VLDL y HDL, disminución de la acción de la insulina); (iii) estimulación del centro respiratorio hipotalámico y (iv) elevación de la temperatura basal e incremento de la excreción renal de sodio y (v) metabolismo óseo, acción directa sobre los receptores osteoblásticos (Guncu et al., 2005).

### ***Andrógenos.***

Los andrógenos están involucrados en la espermatogénesis y son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del varón durante la pubertad. Existen dos tipos de andrógenos: andrógenos gonadales (dihidrotestosterona (DHT)) y andrógenos adrenales (dehidroespiandrosterona), siendo los primeros la forma más activa. Los andrógenos adrenales, androstenediona, se transforman en testosterona y estrógenos, representando una importante fuente de estrógenos en el hombre y mujer postmenopáusica.

Los andrógenos juegan un papel importante en el mantenimiento de la masa ósea e inhibición de la síntesis de prostaglandinas y reducción de la producción de la síntesis de interleukina 6 durante la inflamación (Gornstein et al., 1999).

### ***Mecanismo de acción de las hormonas sexuales esteroideas***

En el torrente sanguíneo, aunque las hormonas se presentan en concentraciones extremadamente bajas, son capaces de inducir sus efectos. El mecanismo de acción de las hormonas esteroideas es dependiente de su unión a receptores para inducir el efecto. Las hormonas sexuales esteroideas circulan unidas a proteínas plasmáticas (aproximadamente en un 98%), siendo el 2% de hormona circulante libre el que tiene la capacidad de penetrar en el interior de la célula por difusión y unirse a los receptores intracelulares, que pueden localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. La unión hormona-receptor transforma al receptor en su forma activa, provocando la activación génica y transcripción en ARN mensajero.

### **I.2.1.4.HORMONAS PLACENTARIAS**

La placenta sintetiza hormonas, tanto proteicas como esteroideas, que comienza precozmente al inicio del embarazo. En la producción hormonal de la placenta existe interacción feto-materno-placentaria. La placenta recibe precursores o sustratos de la madre y del feto para la biosíntesis y una vez elaboradas las hormonas, en la placenta, pasan al feto y a la madre. El sincitiotrofoblasto es el lugar de producción, tanto de las hormonas proteicas como esteroideas.

### ***Hormonas placentarias proteicas***

*Hormona gonadótropa coriónica (hCG).* Su acción biológica más importante es la propiedad luteotrófica, que induce el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo hasta que la placenta es capaz de reproducir suficientes esteroides, lo cual ocurre entre las semanas 6 y 8 del embarazo. Su detección en el plasma materno ocurre 24 horas después de la implantación. Su producción está estimulada por la GnRH.



*Lactógeno placentario humano (HPL)*. Su producción se detecta en el sincitiotrofoblasto a los 12-18 días de la fecundación y en sangre materna a las 5 semanas de gestación. Sus acciones biológicas son: (i) aumentar la lipólisis para incrementar los ácidos grasos libres como fuente de energía; (ii) aumentar la resistencia a la insulina, incrementando la concentración de insulina y glucosa; (iii) disminuye la gluconeogénesis, aumentando los aminoácidos y facilitando el paso de glucosa y aminoácidos al feto; (iv) estimula la proliferación del epitelio mamario.

*Hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona adenocorticotropa (ACTH)*. Desempeña un papel importante en el desencadenamiento del parto, es un potente vasodilatador y estimula el eje hipófiso-suprarrenal del feto, favoreciendo su maduración.

### ***Hormonas placentarias esteroideas***

La placenta produce progesterona y estrógenos en grandes cantidades, superando ampliamente la producción del ovario en la mujer no gestante.

## **1.2.2. FISIOLOGÍA FEMENINA**

### **1.2.2.1. PUBERTAD**

La pubertad representa el procedimiento de maduración sexual que aporta al individuo la capacidad de reproducción, siendo responsable de los cambios tanto físicos como de comportamiento. Durante la pubertad, la producción de hormonas sexuales incrementa hasta alcanzar un nivel que permanecerá constante durante todo el período reproductivo del individuo. Estos cambios en los niveles hormonales han sido relacionados con un incremento de la gingivitis, con un pico de prevalencia establecido en 12 años y 10 meses para la mujer, y 13 años y 7 meses para el hombre sin incrementos asociados en los niveles de placa (Sutcliffe, 1972).

### **1.2.2.2. CICLO MESTRUAL**

El ciclo genital femenino representa el conjunto de fenómenos anatomofisiológicos que se repiten periódicamente en la mujer desde la pubertad hasta la menopausia, durante toda la etapa de madurez sexual. El proceso se encuentra regido por el hipotálamo y la hipófisis, los cuales segregan hormonas proteicas que actúan como mediadores químicos para regular el proceso.

El objetivo del ciclo genital femenino es la preparación de la mujer para una posible fecundación, siendo la ovulación el fenómeno principal. La función del ovario es doble: la liberación de células germinales capaces de ser fecundadas y la secreción hormonal. Cada ciclo menstrual tiene una duración que oscila entre 26 y 32 días, con escasas variaciones intra-individuales. Los fenómenos que se

asocian a la ovulación se acompañan de la secreción rítmica de hormonas ováricas, las cuales preparan al organismo para la fecundación. Debido a que la menstruación es el fenómeno más llamativo del ciclo, su aparición se considera normalmente la fecha de inicio del mismo, aunque la aparición de la hemorragia menstrual representa el final de un ciclo sin fecundación.

### **1.2.2.3. CICLO OVÁRICO**

Los ovarios albergan en su zona cortical numerosas formaciones denominadas folículos primordiales. En su interior se albergan las células germinales (oocito primario, Oocito I), que se encuentran detenidos en la diplotene de la profase meiótica desde antes del nacimiento. Esta célula está rodeada de una capa de células epiteliales planas que corresponden a las células de la capa granulosa, por fuera de las cuales encontramos el estroma ovárico.

La liberación del oocito en la ovulación divide el ciclo ovárico en dos fases: fase de maduración folicular y fase de cuerpo lúteo.

#### *Fase de maduración folicular o fase folicular.*

La fase folicular, de duración variable, se prolonga desde el primer día de hemorragia hasta la ovulación, provocada por el aumento de la hormona luteinizante. Durante la primera mitad de la fase, la glándula hipófisis aumenta su secreción de hormona foliculoestimulante y en consecuencia estimula el crecimiento de 3 a 30 folículos, cada uno de los cuales contiene un óvulo. Mientras se produce el fenómeno de atresia en la mayoría de los folículos, uno de los folículos (rara vez dos) continúa su crecimiento para convertirse en el folículo dominante. Este folículo dominante agranda aún más su cavidad antral y va aproximándose a la superficie del ovario, donde conforma una prominencia en forma de vesícula ricamente vascularizada. La fase ovulatoria se inicia al aumentar la hormona luteinizante. La liberación del óvulo se produce entre 16 y 32 horas después del aumento hormonal.

#### *Fase de cuerpo lúteo*

Esta fase tiene una duración más constante ( $14 \pm 2$  días) y se produce tras la ovulación, salvo que tenga lugar la fertilización. Esta fase finaliza con el inicio del ciclo menstrual. Si no se produce el embarazo, el cuerpo lúteo inicia su involución hacia el décimo día después de la ovulación.

Las alteraciones de los ovarios durante el ciclo sexual mensual dependen de las hormonas gonadótropas (FSH y LH). Los ovarios no estimulados por estas hormonas permanecen inactivos, como ocurre durante la infancia, en la cual la secreción de gonadotropinas es casi nula. En la

pubertad, la hipófisis comienza la secreción de FSH y LH, lo cual conlleva a la instauración de los ciclos mensuales. Tanto la FSH como la LH estimulan a las células efectoras en los ovarios para la síntesis de hormonas ováricas. Tras la menarquia, se instaura periodicidad en la secreción de estrógenos y progesterona responsables de la ovulación continuada hasta la menopausia. Durante la fase folicular, los niveles de estrógenos incrementan progresivamente con un pico máximo preovulatorio, que da comienzo a la fase secretoria, caracterizada por el incremento en los niveles de progesterona y la ovulación. Tras la ovulación, la fase lútea se caracteriza por el incremento en la secreción de estrógenos y progesterona. En los días finales del ciclo, si la fertilización no ha ocurrido, los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol disminuyen tras la degradación del cuerpo lúteo.

#### **1.2.2.4. EL EMBARAZO**

Si el óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo inicia la secreción de *gonadotropina coriónica humana*, hormona que mantiene el cuerpo lúteo, productor de progesterona, hasta que el feto en crecimiento pueda producir sus propias hormonas.

El embarazo representa la etapa con mayores cambios endocrinos. Durante este período, tanto progesterona como estrógenos se elevan debido a la producción continuada por el cuerpo lúteo. Al final del tercer trimestre, progesterona y estrógenos alcanzan niveles plasmáticos de 100 y 30 ng/ml respectivamente, lo cual representa niveles entre 10 y 30 veces superiores a los detectados durante el ciclo menstrual normal (Zachariasen 1989, Amar & Chung 1994, Mariotti 1994).

## EL PERIODONTO: DIANA DE HORMONAS SEXUALES ESTEROIDEAS

---

### **I.3.1. HORMONAS SEXUALES: MECANISMO DE ACCIÓN**

Las hormonas sexuales ejercen su efecto a través de receptores intracelulares, que regulan la expresión génica tras el reconocimiento y unión específica receptor-hormona (Mariotti, 1994). Las hormonas circulan por el torrente sanguíneo principalmente unidas a proteínas plasmáticas (98%). La porción hormonal libre es la que puede entrar en la célula por difusión y unirse a los receptores macromoléculas, que pueden localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. En el caso de las hormonas gonadales, los receptores generalmente se localizan en el núcleo. La unión de la hormona al receptor transforma al receptor en su configuración activa, uniéndose a elementos nucleares regulatorios (steroid responsive element, SRE) que provocan la activación génica y la transcripción en RNA mensajero.

Los tejidos periodontales son modulados por estrógenos, andrógenos y progestágenos, cuya actividad es ejecutada a través de los receptores hormonales. Los receptores hormonales se localizan exclusivamente en las células sobre las que ejercen su acción, denominadas células diana (Mariotti 1994).

### **I.3.2. RECEPTORES HORMONALES EN EL PERIODONTO**

Diversos estudios han tratado de demostrar la presencia de receptores celulares de hormonas sexuales en los tejidos orales, ya que la respuesta celular potencial depende de su expresión, aunque se observan discrepancias en los resultados observados. La presencia de receptores de estrógenos (ER) y receptores de progesterona (PR) fue evaluada inicialmente mediante técnicas de detección indirectas. Formicola et al (1970) expuso la encía murínica a estradiol radiomarcado *in vivo* y constató la acumulación y retención del estradiol marcado similar al observado en útero entre 1-4 horas de la inyección subcutánea. Vittek (1982) observó mediante radiodiagnóstico captación intranuclear de estradiol en las capas basal y espinosa del epitelio gingival, fibroblastos presentes en tejido conectivo así como en células endoteliales y pericitos de los vasos sanguíneos de la lámina propia. Otras técnicas indirectas empleadas han sido la detección de ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Parkar et al. (1996) obtuvo resultados negativos, mientras que Morishihita et al. (1999) encontraron la presencia de ER en células del ligamento periodontal (LPD).

Los receptores ubicados en fibroblastos gingivales, dispersos por la lámina propia (Aufdemorte and Sheridan, 1981) y presentes en el ligamento periodontal (Namba et al, 1989) ejercen su acción sobre el periodonto (Markou et al., 2009). Los fibroblastos son histopatológicamente las principales células implicadas en la reparación y sobrecrecimiento tisular (Tipton et al., 1997). Kawahara y cols (2003) realizaron un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales y observaron que la expresión de receptores PR de fibroblastos incrementa durante la mitosis celular y disminuye durante la interfase. Tang et al. (2008) detectaron que en el ligamento periodontal el subtipo ER predominante es el receptor- $\beta$  frente al receptor- $\alpha$ .

Los receptores ubicados en células osteoblásticas ejercen un mecanismo de acción directa sobre el hueso (Klinger & Sommer 1978, Aufdemorte & Sheridan 1981, Eriksen 1988), siendo la deficiencia estrogénica el factor patogénico dominante de la osteoporosis en la mujer postmenopáusica.

### **I.3.3. EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS EN EL PERIODONTO**

En el periodonto, los estrógenos han demostrado ejercer las siguientes propiedades (Tabla 2):

- Incrementan la inflamación gingival sin cambios en los niveles de placa. Reinhardt (1999) observó mediante un estudio prospectivo que las pacientes postmenopáusicas con déficit de estrógenos presentaron mayores niveles de inflamación y una tendencia a presentar mayor frecuencia de pérdida de inserción clínica  $\geq 2$  mm, sugiriendo que los mediadores inflamatorios podrían verse afectados por alteraciones en los niveles hormonales.
- Inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-6 (Gordon et al., 2001).
- Reducen la inflamación mediada por células T (Josefsson et al. 1992).
- Reducen la producción de leucocitos por la médula ósea (Josefsson et al., 1992, Cheleuitte et al., 1998).
- Inhiben la quimiotaxis de PMN (Ito et al., 1995).
- Estimulan la fagocitosis de PMN (Hofmann et al. 1986).
- Incrementa la proliferación de vasos sanguíneos (Lindhe 1967 a,b).
- Estimula la proliferación de fibroblastos gingivales (Beagrie et al. 1996).
- Estimula la síntesis y maduración de tejidos conectivos gingivales (Beagrie et al. 1996).

*Tabla 2.* Efectos de los estrógenos sobre el periodonto.

#### **I.3.4. EFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PERIODONTO**

A nivel oral, la progesterona también ha demostrado tener efectos directos sobre el periodonto (Tabla 3):

- Aumenta la producción de prostaglandinas (El Attar 1976, Smith, 1986).
- Incremento de PMN y PGE<sub>2</sub> en el fluido crevicular gingival (El Attar 1976, Ferris et al. 1993)
- Reducción de los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides (Chen et al. 1977)
- Alteración en la síntesis de colágeno y no colágeno por los fibroblastos del LPD (Sooryamorthy et al. 1989, Tilakaratne et al. 1999).
- Inhibe la proliferación de fibroblastos gingivales (Mealey et al. 2003)
- Altera el metabolismo de los fibroblastos del ligamento periodontal, alterando la tasa y patrón de producción de colágeno, reduciendo el potencial de reparación y mantenimiento (Pack 1980, Thompson 1982).
- Incrementa el metabolismo de folatos, necesario para el mantenimiento y reparación (Pack 1980, Thompson 1982).
- Incrementa la dilatación vascular, incrementando la permeabilidad (Mascarenhas et al. 2004).

*Tabla 3.* Efectos la progesterona sobre el periodonto.

# GINGIVITIS INDUCIDA POR PLACA

---

La placa bacteriana juega un papel indiscutible en el desarrollo de gingivitis y periodontitis (Loe et al., 1965, Loe et al., 1967, Theilade et al., 1966, Lindhe and Nyman, 1975). En el caso de la periodontitis, los estudios demuestran que la susceptibilidad a padecer esta entidad en sus diferentes formas varía ampliamente entre los individuos (Løe et al., 1986), en gran medida debido a factores genéticos (Hart & Kornman 1997, Michalowicz et al. 2000). Por el contrario, la evidencia es limitada en relación a los estudios que evalúan la susceptibilidad del huésped a padecer gingivitis.

La gingivitis inducida por placa es la patología más prevalente que presenta el periodonto (Armitage 1999). Los estudios pioneros de gingivitis experimental de Løe et al. (1965) y Theilade et al. (1966) confirmaron el papel etiológico de la placa dental bacteriana. Los estudios de intervención, en los que la eliminación de la placa dental se asocia a la resolución del cuadro clínico, avalan la etiopatogenia de la gingivitis (Løe et al., 1965, Trombelli et al., 2004).

El método habitual de evaluación de la inflamación gingival es el empleo de índices para ponderar clínicamente los cambios inflamatorios gingivales, con el inconveniente principal de la naturaleza subjetiva de los mismos. Se han propuesto otros métodos de mayor objetividad, como la cuantificación del fluido crevicular gingival (Golub & Kleinberg 1976, Ciantar & Caruana 1998), la composición del biofilm subgingival (Moore et al., 1984) y la determinación de marcadores de la inflamación en FCG (Lamster et al., 1985).

## **I.4.1. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN CLÍNICA**

Múltiples factores sistémicos y ambientales son capaces de modificar la inflamación gingival. Sin embargo, la severidad de la inflamación gingival es principalmente dependiente de los aspectos cuantitativos (Løe et al. 1965, Breuer & Cosgrove 1989) y cualitativos (Moore et al. 1982) de la placa bacteriana. No obstante, a pesar del papel universal de la acumulación de placa en el estatus gingival, existe evidencia que avala que la inflamación gingival desarrollada ante niveles de placa similares varía entre individuos, sugiriendo el papel del hospedador en la modulación del cuadro gingival (origen genético a ambiental).

### **I.4.4.1. FACTORES LOCALES**

Comprenden todos aquellos factores que favorecen la acumulación de placa, entre los que se

encuentran:

- Anomalías anatómicas, como surcos radiculares profundos (Hou & Tsai 1993), perlas del esmalte (Goldstein 1979) y apiñamiento dentario (Chung et al., 2000).
- Condiciones patológicas dentarias, tales como fracturas (Polson 1977) y caries (Albandar et al., 1995).
- Condiciones gingivales anatómicas, como recesiones gingivales (Smukler & Matchei 1987) y malposiciones de frenillo o frenillos aberrantes (Addy et al., 1987).
- Factores iatrogénicos, entre los que se incluyen restauraciones con márgenes subgingivales (Waerhaug 1975, Bader et al., 1991), restauraciones desbordantes (Lang et al., 1983), prótesis removibles (Yeung et al., 2000) y aparatología ortodóncia (Boyd & Baumrind 1992).
- Variantes anatómicos maxilofaciales, como sellado labial incompetente y/o obstrucciones del tracto respiratorio superior (ej. desviación del tabique nasal) que provocan respiración oral, la cual provoca cambios en la acumulación de placa y expresión de la gingivitis, particularmente en el sector anterosuperior (Gulati et al., 1998).

#### **I.4.1.2. FACTORES SISTÉMICOS**

Siguiendo la clasificación actual de las enfermedades gingivales (Armitage et al. 1999), se pone de manifiesto que los factores sistémicos son capaces de modificar la inflamación gingival, bien de forma inherente al huésped o bien relacionada con factores sistémicos adquiridos por el huésped (Mariotti 1999).

- *Factores metabólicos.* Los cambios endocrinos, tanto fisiológicos como patológicos, han demostrado su influencia sobre la expresión de la gingivitis:
  - Cambios fisiológicos. Se incluyen los cambios gingivales asociados a la pubertad (Mombelli et al., 1989), menstruación (Holm-Pedersen & Løe 1976) y embarazo (Silness & Løe 1965, Raber-Durlacher et al., 1994).
  - Cambios patológicos. La diabetes es la una condición endocrina que ha demostrado influir sobre la inflamación gingival (Cuttler et al. 1999).
- *Factores genéticos.* La respuesta a la placa dental varía entre individuos expuestos a un biofilm subgingival de cantidad y calidad similar (Lie et al. 1995, 1998). Wiedemann et al. (1979) evaluó la respuesta a la acumulación de placa en un grupo de 62 individuos durante 21 días. Ocho pacientes no desarrollaron gingivitis a pesar de la acumulación de placa, mientras que 25 sujetos mostraron inflamación gingival marcada y los restantes 29 individuos formaron un grupo de inflamación intermedia. En un estudio similar con 45 sujetos, van der Weiden (1994) observó que 10 individuos presentaron más inflamación



de la media (grupo susceptible), mientras que 6 sujetos desarrollaron inflamación leve (grupo resistente), sin poder atribuir las diferencias a variaciones cualitativas en los patógenos del biofilm (Lie et al. 1995). A partir de estos resultados (Weidemann et al. 1974, van der Weijden et al. 1994) puede estimarse que aproximadamente el 13% de los sujetos representa el “grupo resistente”. Trombelli et al. (2004) validaron el modelo de gingivitis experimental en un ensayo clínico a boca partida. Se evaluaron 96 sujetos con salud gingival sobre los cuales se indujo gingivitis experimentalmente en un cuadrante durante 21 días mediante férulas oclusivas. Tras el análisis de resultados, se pudo confirmar la identificaron dos subpoblaciones (baja/alta reactividad), basado en los cuartiles superior e inferior del fluido crevicular gingival (FCG). Esto implica que existen diferencias en la presentación clínica de la inflamación gingival entre sujetos, ante cantidades y tasa de acumulación de placa bacteriana similar.

Estudios de gingivitis experimental realizados con pacientes con síndrome de Down han demostrado que presentan una inflamación gingival más severa frente al grupo control (Reuland-Bosma et al. 1986, 1988).

- *Factores ambientales.*

- Tabaco. El tabaco ha demostrado su influencia sobre la expresión clínica de la gingivitis, dado que los fumadores presentan menor inflamación que los no fumadores en estudios de gingivitis experimental (Bergstrom & Preber 1986, Lie et al. 1998). No se observaron diferencias significativas en la composición de la microbiota entre fumadores y no fumadores (Lie et al. 1998).
- Medicamentosos. Varios fármacos han demostrado ejercer efectos adversos sobre el tejido gingival. Determinados fármacos han demostrado provocar hipertrofia tisular como respuesta a la acumulación de placa, entre los que se encuentran los anticonvulsivos como la fenitoína (Seymour 1993), anti-hipertensivos bloqueantes de los canales de calcio como nifedipino (Nery et al. 1995) e inmunosupresores como ciclosporina (Seymour & Jacobs 1992).

Los antiinflamatorios, tanto esteroideos (Markitziu et al. 1990) como no-esteroideos (Jones et al. 1999) actúan inhibiendo la respuesta del huésped y por consiguiente inhibiendo la expresión clínica de la gingivitis. Los antimicrobianos sistémicos y tópicos también han demostrado inhibir la formación de placa y por consiguiente la gingivitis (Listgarten et al. 1979, Capelli et al. 2000).

Estudios previos han demostrado que los anticonceptivos pueden provocar efectos similares a los acontecidos durante el embarazo (Lindhe et al. 1969, Kalwarf et al. 1978). Sin embargo, estudios recientes muestran que los efectos de los nuevos anticonceptivos (con concentraciones hormonales reducidas) sobre el periodonto son prácticamente nulos (Klinger et al. 1998, Preshaw et al. 2001).

- Dieta. El único factor nutricional relacionado con incrementos en la expresión de la gingivitis es la deficiencia en ácido ascórbico (Leggott et al. 1986, 1991).
- *Otros factores sistémicos.* Otras condiciones sistémicas que afectan a la gingivitis inducida por placa incluyen la neutropenia (Rylander et al. 1975), leucemia (Bergmann et al. 1992) y SIDA (Glick et al. 1990). El estrés es otro factor que eleva la expresión de la gingivitis, aunque los resultados son difíciles de interpretar debido a que se asocian a incrementos en los niveles de placa (Deinzer et al. 2001).

# EMBARAZO & GINGIVITIS:

## LA GINGIVITIS GESTACIONAL

---

### 1.5.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La primera publicación acerca de la gingivitis del embarazo fue realizada por Coles (1874). Monash et al. (1926) propusieron el nombre de “gingivitis proliferativa del embarazo”, debido a que observaron que el sobrecrecimiento gingival comenzaba al principio del embarazo, incrementaba en tamaño conforme evoluciona el embarazo e involuciona tras el parto. Apuntaron que no existían diferencias con la gingivitis convencional a excepción de la marcada condición edematosa de los tejidos. Hishfield (1939) presentó una descripción clínica del cuadro. Describe la gingivitis del embarazo como la proliferación edematosa de la encía interproximal como consecuencia de la proliferación tisular subgingival. Según el autor, esta proliferación puede alcanzar en ocasiones la cara oclusal y extenderse lateralmente. La coloración predominante en la región central es rojo-azulado, mientras que en la periferia destaca el rojo brillante. La marcada reacción inflamatoria puede ser concomitante a la pérdida temporal de función e higiene. Burket et al. (1946) añade que el momento del embarazo en el cual suele desarrollarse la gingivitis gestacional es en el segundo trimestre y coincide con la descripción de hipertrofia en la papilas interdetales. Describe que el dolor sólo aparece en los casos severos.

Desde entonces, la salud periodontal de la mujer gestante ha sido objeto de interés y numerosas publicaciones se han presentado al respecto hasta la fecha actual. No obstante, la información actualmente disponible es, al menos en parte, controvertida tal y como se expone a continuación.

### 1.5.2. PREVALENCIA. EVOLUCIÓN DURANTE EL EMBARAZO.

Durante el embarazo, se ha descrito un incremento en la severidad y prevalencia de la gingivitis gravídica. Estudios transversales y longitudinales han demostrado cambios significativos en la inflamación gingival durante el embarazo no relacionado con cambios en los niveles de placa. Los distintos autores cifran una horquilla de prevalencia que oscila entre el 36 y el 100% (Maier & Orban 1949, Hasson 1960, Loe & Silness, 1963), siendo la discrepancia el resultado de las diferencias metodológicas y poblacionales de los distintos estudios (Tablas 4 y 5).

AUTOR, AÑO, PAÍS	MUESTRA	VARIABLES	MÉTODO	RESULTADOS
<b>Løe &amp; Silness, 1963. Noruega.</b>	- 121 embarazadas (mes 2-9) - 61 postparto.  Clase media-baja	- I. Periodontal Russel (1956) - I. Gingival (Løe & Silness, 1963). - Profundidad sondaje.	Dientes Ramfjord.	- 100% inflamación gingival. - GI: DES embarazo-postparto. - Pico máximo: mes 8. - Cambios mayores: incisivos. - I. Periodontal: No DES embarazo-postparto.
<b>Silness &amp; Løe, 1964. Noruega</b>	- 121 embarazadas (mes 2-9) - 61 postparto.  Clase media-baja	- I. Placa (Silness & Løe, 1974) - I. Cálculo (Ramfjord, 1959)	Dientes Ramfjord	- I. Placa: no DES embarazadas-postparto. - Incremento progresivo de placa, con picos en mes 3 y 8. - Niveles más elevados en molares, incisivos, interproximal.
<b>Katz et al. 1969 Israel</b>	- 11 embarazadas (mes 3-9) - 26 mujeres día del parto - 22 no embarazadas	- I. Periodontal Russell - I. Gingival (Løe & Silness 1963) - I. Placa (Silness & Løe 1964)	Dientes Ramfjord	- Incremento ES de I. Gingival e I. Placa durante el embarazo.
<b>Arafat 1971 EEUU</b>	- 477 embarazadas - 233 no embarazadas.  Gingivitis y periodontitis	- IHO (I. Cálculo/debris, Green & Vermillion 1960). - I. Periodontal Russell (1956)	Boca completa vestibular y lingual	- El 76.7% de las embarazadas presentaron cambios gingivales, frente al 61.9% de las no embarazadas. - El I. Periodontal incrementa con la edad. - En ausencia de placa bacteriana no presentaron alteraciones gingivales.
<b>Adamset al. 1974 Reino Unido</b>	-100 embarazadas -100 no embarazadas (10 semanas postparto o no embarazo)	- I. Gingival (Modificación Løe Silness (papilas anteriores)) - Debris. Presencia/ausencia en vestibular de incisivos y caninos.	Sectores anteriores	- La gingivitis fue más prevalente en el grupo embarazo (58% vs 45.4%). - El sextante 2 presentó más inflamación frente al sextante 5.
<b>Samant et al. 1976. India</b>	- 120 embarazadas (40/trimestre) - 40 no embarazadas.	- I. Gingival (Løe & Silness 1963) - I. Periodontal Russell (1956) - I. Cálculo/debris Green & Vermillion (1967)	Boca completa	- I. Placa: Mayor en el grupo embarazo. DES - I. Periodontal: Sin diferencias en el grupo embarazo. - I. Gingival: Mayor en el grupo embarazo. DES. Mayor en segundo trimestre. Más casos de gingivitis

				severa en tercer trimestre.
<b>Conde 1981. España</b>	- 60 embarazadas.  Clase trabajadora media-baja. Mala HO.	- No especificado	No especificado	Alteraciones gingivales en el 51,67% de las embarazadas. El 25,8% notó un empeoramiento de su estado gingival anterior.
<b>Zaki et al. 1984 Egipto</b>	- 30 embarazadas (10/trimestre) - 10 controles (fase lútea)	-Radioinmunoanálisis (Estrógenos, Progesterona) - I. Placa (Silness & Loe 1964) - I. Gingival (Loe & Silness 1963) - I. Retención (Bjorby & Loe)	No especificado	- I. Placa : Sin DES. - I. Gingival : DES del grupo embarazo respecto al control en segundo y tercer trimestre.
<b>Jonsson et al. 1988. Canadá</b>	- 30 Hombres. - 30 embarazadas. - 30 no embarazadas.  Gingivitis y periodontitis	- I. Placa (presencia/ausencia) - Profundidad de sondaje - Sangrado al sondaje interproximal - Hormonas (RI): progesterona, testosterona, cortisol, estradiol - Microbiología (cultivo).	Boca completa Sonda williams	- No hubo correlación con ninguno de los parámetros clínicos ni hormonales ni microbiológicos.
<b>Miyazaki et al. 1991. Japón</b>	-2424 embarazadas. - 1565 no embarazadas. Clase media-baja. Gingivitis y periodontitis	- CPITN	6 examinadores. Sonda OMS	- Pseudobolsas. Incremento de PS en embarazo, máximo en mes 8.
<b>Muramatsu &amp; Takaesu 1994 Japón</b>	- 19 embarazadas - 12 no embarazadas - 8 postparto (5 meses).	- I. Higiene oral (Green-Vermillion 1960) - Profundidad sondaje - Sangrado al sondaje - Microbiología (cultivo) - Hormonas (radioinmunoanálisis)	Sonda OMS Boca completa	- Sangrado al sondaje: máximo en el segundo trimestre. Incrementa con <i>P.intermedia</i> (máximo en octavo mes.) - <i>P.intermedia</i> . Sin DES  <b>Subgrupos</b> - <i>Low Group</i> . Menos localizaciones con sangrado, enrojecimiento e inflamación. Mejor higiene oral. - <i>High Group</i> . Mayor inflamación, mayor profundidad de sondaje y mayor concentración de hormonas, pero sin DES entre los 3 grupos.
<b>Taani et al. 2003 Jordania</b>	- 200 embarazadas - 200 no	- I. Placa (Silness & Loe, 1964).	Boca completa, 6 locs/diente	- El grupo embarazo presentó mayor

	embarazadas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- I. Gingival (Løe &amp; Silness, 1963).</li> <li>- Profundidad de sondaje.</li> <li>- Nivel de inserción clínica.</li> <li>- Variables sociodemográficas</li> </ul>		<p>inflamación gingival y profundidades de sondaje aumentadas respecto al grupo control.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Las embarazadas con mayor tasa de vómito presentaron mayor I. Gingival y profundidad de sondaje.</li> <li>- Bajo nivel socioeconómico relacionado con empeoramiento clínico</li> </ul>
<b>Acharya &amp; Bhat 2009. Egipto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2859 embarazadas</li> <li>- 237 no embarazadas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuestionario de salud oral percibida</li> <li>- CPITN</li> <li>- I. Gingival (Silness &amp; Løe, 1963)</li> </ul>	Dientes índice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CPITN mayor en embarazo.</li> <li>- Mayor I. Gingival en embarazo.</li> <li>- La salud oral percibida fue peor en el grupo embarazo.</li> </ul>

*Tabla 4.* Estudios transversales que muestran la prevalencia de la gingivitis del embarazo, reflejando el diseño del estudio empleado por los diferentes autores. En el Anexo 1 se detallan los diferentes tipos de índices utilizados para medir la inflamación gingival. DES (diferencias estadísticamente significativas). PII (Índice de placa), GI (Índice gingival). PS (profundidad de sondaje). CPITN (Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal de la Comunidad).

AUTOR, AÑO	MUESTRA	VARIABLES	MÉTODO	RESULTADOS
<b>Cohen et al. 1969. EEUU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 16 embarazadas (&lt; 20 semanas).</li> <li>- Sin grupo control.</li> </ul> <p>Gingivitis y periodontitis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- I. Periodontal (Modificación O'Leary)</li> <li>- I. Irritantes (duros y blandos)</li> <li>- I. Movilidad.</li> </ul>	Boca completa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- I. Periodontal: sin DES.</li> <li>- I. Gingival: presentó mayores variaciones (sin DES).</li> <li>- El sextante 5 presentó la mayor inflamación.</li> <li>- I. Irritantes: sin variaciones ES.</li> <li>- No empeoramiento periodontal.</li> </ul>
<b>Cohen et al. 1971. EEUU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 15 embarazadas, (&lt;20 semanas-15 meses postparto).</li> <li>- 16 no embarazadas.</li> </ul> <p>Gingivitis y periodontitis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- I. Periodontal (Modificación O'Leary)</li> <li>- I. Irritantes (duros y blandos)</li> <li>- I. Movilidad.</li> </ul>	Boca completa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- I. Gingival: fue mayor durante embarazo. Al año no hubo diferencias entre embarazadas y no embarazadas.</li> <li>- Placa y cálculo incrementaron progresivamente en ambos grupos, sin DES.</li> </ul>

<b>Hugoson 1971 Suecia</b>	- 26 embarazadas (12 semanas - 5 meses postparto). - Sin grupo control.  Gingivitis y periodontitis	- Exudado gingival (Brill, Egelberg 1964). - I. Gingival (Løe & Silness & 1963) - I. Placa (Silness & Løe 1964) - Profundidad de sondaje.	Dientes índice. Tras el parto, 15/26 pacientes recibieron raspado y alisado radicular.	- Exudado gingival: Incrementó progresivamente. Pico máximo en 38 semanas. - I. Gingival: Todas las pacientes mostraron inflamación gingival, mayor en molares e interproximal. - PS: Sin DES. - I. Placa: Disminuye, pero sin DES.
<b>Chaikin 1977 EEUU</b>	- 267 embarazadas de cualquier mes. Evaluación mensual. - 152 mujeres en mantenimiento que se quedan embarazadas.	I. Gingivitis empleado: papilar, marginal, alveolar.	Boca completa  Visitas mensuales.	<b>Estudio 1.</b> - 36% gingivitis leve-moderada. - 66% mala HO. - Postparto (3 semanas). La gingivitis sólo se redujo si se eliminó placa y cálculo. <b>Estudio 2.</b> Con buen control de placa, la incidencia de gingivitis fue de 0.03%.
<b>O'Neil 1979 Inglaterra</b>	- 26 embarazadas - Sin grupo control.	- I. Gingival (Løe & Silness 1963) - I. Placa (Silness & Løe 1964) - Progesterona y Estradiol. Radioinmunoanálisis.	- Dientes Ramfjord.  IHO en semana 14.	- I. Placa: Se produce disminución por instrucciones de higiene oral, aunque sin DES. - I. Gingival: Incrementa a lo largo del embarazo. - Sin correlaciones clínica-hormonas.
<b>Cerna et al. 1988 República Checa.</b>	- 39 embarazadas - Sin grupo control.	- I. Periodontal Russell (1956). - I. Gingival (Løe & Silness 1963) - SBI index en dientes anteroinferiores. - I. Higiene oral (Green y Vermillion)	Incisivos superiores e inferiores	- No DES en el I. periodontal. - I. Gingival: Incremento significativo del mes 3 al 8. Mayor en incisivos superiores respecto a inferiores.
<b>Machuca et al. 1999. España</b>	- 130 embarazadas	- I. Placa (O'Leary) - Sangrado al sondaje - Profundidad de sondaje - Nivel inserción clínico	Boca completa, 4 locs/diente	- El I. Placa incrementó con nivel profesional bajo, bajo nivel educacional, tratamiento periodontal infrecuente y vivir en zonas rurales. - Sangrado al sondaje del 68%. Relacionado con los mismos factores que I. Placa. - No pérdida de inserción.
<b>Tilakaratne et al. 2000. India</b>	- 47 embarazadas - 47 no embarazadas. Mismo nivel	- Cuestionario nivel socioeconómico. - I. Placa (Silness & Løe 1964),	Boca completa Sonda Brodentic. Calibración	- Nivel socioeconómico comparable. - I. Placa: Sin DES. - I. Gingival: DES en

	socioeconómico, raza y hábitos.	- I. Gingival ( Løe & Silness 1963) - Pérdida inserción.	intra-examinador	todos los trimestres.
<b>Yalcin et al. 2002. Estambul</b>	- 61 embarazadas. - Sin grupo control.  Mismo nivel socioeconómico.	- Cuestionario socioeconómico - I. Placa (Silness & Løe 1964). - I. Gingival (Løe & Silness 1963). - Profundidad de sondaje.	Boca completa. Sonda Williams Trimestres: 1, 2 y 3. Instrucciones higiene oral.	- I. Placa: DES. - I. Gingival: DES - El nivel socioeconómico influyó en los resultados.
<b>Gürsoy et al. 2008. Finlandia</b>	- 21 embarazadas - 22 no embarazadas.  No periodontitis, no fumadoras.	- Cuestionario. - I. Placa visible (VPI) - Sangrado al sondaje - Profundidad de sondaje - Nivel de inserción clínico.	- Full mouth -1, 2, 3 trimestres, 4-6 semanas postparto y tras lactancia. Profilaxis +instrucciones de higiene Sonda OMS	- 75% formación mínimo preuniversitaria. - VPI. Disminuye (IHO), pero mayor en grupo embarazo - Sangrado: Máximo en segundo trimestre - Sin pérdida de inserción clínica.

*Tabla 5.* Estudios longitudinales que muestran la prevalencia de la gingivitis del embarazo, reflejando el diseño del estudio empleado por los diferentes autores. En el Anexo 1 se detallan los diferentes tipos de índices utilizados para medir la inflamación gingival. DES (diferencias estadísticamente significativas). PII (Índice de placa), GI (Índice gingival). PS (Profundidad de sondaje). CPITN (Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal de la Comunidad).

### 1.5.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Clínicamente no existen diferencias entre la gingivitis asociada al embarazo respecto a la gingivitis inducida por placa, a excepción de la propensión a exacerbar la inflamación gingival sin cambios en la cantidad de placa presente (Mariotti et al. 1999). Los signos clínicos asociados se describen en la tabla 6.

- Presencia de placa en el margen gingival.
- Pronunciada respuesta inflamatoria gingival.
- Establecimiento durante el embarazo (2º o 3º trimestre)
- Cambios en el color gingival.
- Cambios en el contorno gingival.
- Incremento del exudado gingival.
- Sangrado al sondaje.
- Ausencia de pérdida de inserción.
- Ausencia de pérdida ósea.
- Reversible tras el parto.

*Tabla 6.* Descripción de las características clínicas que acompañan a la gingivitis gestacional.



La forma de presentación puede variar desde inflamación gingival leve hasta hiperplasia severa, dolor y sangrado espontáneo. En una cohorte de mujeres embarazadas, Samant et al. (1976) obtienen un 50% de gingivitis leve, 32-55% gingivitis moderada y 6.6% de casos con gingivitis severa. Otras características clínicas descritas comunes son el incremento de la profundidad de sondaje, incremento de la tasa de fluido crevicular gingival y sangrado al sondaje (Fig. 1).



*Figura 1.* Caso clínico en el que se aprecia el incremento de la inflamación gingival ante cantidad de placa leve.

Los cambios inflamatorios de la gingivitis del embarazo generalmente comienzan a manifestarse durante el segundo mes de embarazo y van incrementando progresivamente hasta el octavo mes de gestación. En el noveno mes comienza la recesión del cuadro inflamatorio, coincidiendo con la disminución de los niveles de hormonas sexuales esteroideas (Løe & Silness, 1963). Después del parto, los índices gingivales tienden a normalizarse e igualarse al segundo mes de embarazo. Según los diferentes estudios, el grado máximo de inflamación puede obtenerse tanto en el segundo trimestre (Arafat et al, 1974, Samant et al, 1976, Muramatsu et al. 1994, Gürsoy et al. 2008) como en el tercer trimestre (Løe & Silness 1963, Cohen et al. 1969, Hugoson et al. 1971, Kornman et al, 1980, Zaki et al. 1984, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002, Taani et al. 2003) (Tabla 7).

Hugoson et al. (1971) realizó un subanálisis de las 8 pacientes con el mayor índice gingival, así como de las 8 que registraron los valores más bajos de este índice. Analizando los resultados observaron que ambos grupos mostraron un incremento progresivo del índice gingival, aunque fue más marcado para el subgrupo inicial con mayores valores.

AUTOR, AÑO	ÍNDICE GINGIVAL	1 TRIMESTRE	2 TRIMESTRE	3 TRIMESTRE	POSTPARTO
<b>Löe &amp; Silness 1963</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.04±0.0092	1.05±0.063	<b>1.26±0.093</b>	0.85±0.009
<b>Cohen et al. 1969</b>	Índice periodontal Cohen 1969	2.23±0.13	2.48±0.14	<b>2.57±0.14</b>	2.31±0.16
<b>Katz et al. 1969</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	0.79	<b>1.12</b>	0.89	-
<b>Hugoson 1971</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	0.92±0.04	1.1	<b>1.34±0.06</b>	0.6
<b>Arafat 1974</b>	Índice Periodontal Russell 1956	0.77	<b>0.94</b>	0.72	-
<b>Samant et al. 1976</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	0.71±0.09 GS: 2.5%	<b>1.04±0.1</b> GS: 7.5%	0.94±0.1 GS: 10%	-
<b>O'Neil 1979</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.14	-	1.32	-
<b>Kornman &amp; Loesche 1980</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.16	1.44	<b>1.61</b>	-
<b>Zaki et al. 1984</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.39±0.22	1.73±0.32	<b>1.84±0.45</b>	-
<b>Muramatsu &amp; Takaesu 1994</b>	Sangrado al sondaje	2 meses: 1.67 3 meses: 2.00	4 meses: 4.58 <b>5 meses: 6.68</b> 6 meses: 5.00	7 meses: 5.00 8 meses: 3.45 9 meses: 3.91	3.27±1.54
<b>Tilakaratne et al. 2000</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.15	1.28	<b>1.43</b>	1.14
<b>Yalcin et al. 2002</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	1.79±0.35	1.95±0.38	<b>1.99±0.37</b>	-
<b>Taani et al. 2003</b>	Índice Gingival Löe & Silness 1963	2.06±0.11	2.50±0.06	<b>2.60±0.05</b>	-
<b>Gürsoy et al. 2008</b>	Sangrado al sondaje	25%	<b>34%</b>	28%	8%

Tabla 7. Estimación de la inflamación gingival por trimestres según los diferentes autores. Se resalta en negrita el trimestre del embarazo en el cual la inflamación gingival fue más acusada. GS (Gingivitis severa).

#### 1.5.4. DISTRIBUCIÓN INTRAORAL

Los molares constituyen la localización que generalmente presenta mayor inflamación, aunque proporcionalmente las áreas anteriores son las que sufren el mayor cambio inflamatorio, dado que las zonas posteriores presentan mayor cantidad de placa (Löe & Silness 1963, Raber-Durlacher et al. 1994). Entre ambos sextantes anteriores, el sextante anterosuperior presentó mayor inflamación respecto al sextante anteroinferior (Adams et al., 1974, Cerna et al., 1990). En relación a la inflamación según superficie, en orden decreciente las localizaciones interproximales son las que presentan mayor inflamación, seguido de las superficies lingual y vestibular respectivamente (Löe & Silness, 1963).

### **1.5.5. GRANULOMA GRAVÍDICO**

El granuloma gravídico, también conocido como “tumor del embarazo” o “granuloma del embarazo” presenta una prevalencia que oscila entre el 0.5-9.6%. Se trata de crecimientos exofíticos de base pedunculada que cursan con sintomatología dolorosa y se localizan principalmente en el sector anterior del maxilar superior. Se generan como consecuencia de una respuesta exagerada a agentes irritantes, como el cálculo dental. Se trata de lesiones de crecimiento rápido, fácil sangrado, color azul-violáceo y cuyo tamaño generalmente no supera los 2 cm de diámetro. Histológicamente se trata de una proliferación vascular rodeada de tejido conectivo edematoso y un infiltrado linfoplasmocitario sobre epitelio adelgazado de aspecto atrófico (Salum et al., 2008, Yuan and Lin, 2004).

### **1.5.6. PAPEL DE LA PLACA BACTERIANA**

Estudios previos en periodoncia han demostrado el papel de la placa bacteriana como factor etiológico en el inicio de gingivitis y periodontitis (Lindhe and Nyman, 1975, Socransky and Haffajee, 1992, Marsh et al.) Del mismo modo, la placa bacteriana es el factor crucial para el desarrollo de la gingivitis del embarazo, ya que se trata de una enfermedad gingival inducida por placa y exacerbadada por el sistema endocrino (Mariotti et al. 1994). En áreas gingivales sin inflamación preexistente, las cuales permanecen libres de placa, se ha demostrado que no se desarrolla gingivitis del embarazo. Ésto implica que el embarazo en sí mismo no causa gingivitis, sino que se trata de un factor agravante de los cuadros inflamatorios gingivales preexistentes. Arafat et al. (1974), en un estudio transversal con 477 embarazadas, confirmó que las pacientes con índice de higiene cero (Índice de Higiene Oral Green & Vermillion, 1960) no desarrollaron alteraciones gingivales. Corroborando estos hallazgos, Chaikin et al. (1977) realizó un estudio longitudinal con 267 mujeres embarazadas (grupo 1) y 152 mujeres en estricto mantenimiento, las cuales se quedaron embarazadas (grupo 2). En el grupo de mujeres embarazadas, el 36% presentaron gingivitis leve-moderada (66% de las cuales con mala higiene oral) y el 0,07% presentaron tumores del embarazo. En este grupo, el 0,075% tenían periodontitis. Por el contrario en el grupo 2, donde las pacientes presentaban buen control de placa, la incidencia de gingivitis fue solamente del 0,03%, en forma de gingivitis leve. Estos estudios confirman que sin la presencia de placa bacteriana la incidencia de gingivitis del embarazo es prácticamente nula.

En la gingivitis gravídica es característico que se produzca un incremento del estado inflamatorio gingival sin que se produzcan cambios en los niveles de placa (Løe & Silness 1963, Silness & Løe 1964, Cohen 1969, Hugoson 1971, Arafat 1974, Samant 1976, O’Neil 1979, Zaki 1984, Tilakaratne 2000, Yalcin 2002, Taani 2003, Gürsoy 2008) (Tabla 8). En 1963, Løe & Silness constataron que se producía un incremento en los niveles de inflamación gingival en una muestra de 121 embarazadas sin que se dieran cambios significativos en los niveles de placa. A raíz de esta publicación, en 1964

evaluaron el papel que había ejercido el factor placa sobre esa cohorte de mujeres embarazadas. Para ello desarrollaron un nuevo índice, conocido como índice de placa de Silness & Løe, el cual puntúa de 0-3 la acumulación de depósitos blandos sobre la superficie dentaria en dientes índice. Como resultado de este estudio concluyeron que no existían diferencias entre el índice de placa de mujeres embarazadas respecto a las no embarazadas y que no existía correlación entre los cambios en la inflamación con los cambios en los niveles de placa, lo cual sí pudo determinarse postparto. Por estos motivos, el incremento de la inflamación gingival durante el embarazo no es explicable solamente por la acción de la placa bacteriana. Los niveles más altos de placa se observaron en molares e incisivos inferiores, tanto para embarazadas como para mujeres postparto. Las áreas con mayores depósitos fueron las áreas interproximales (70%), seguido de áreas linguales (20%) y vestibulares (10%).

Uno de los inconvenientes de los estudios de Silness & Løe (1963, 1964) es la utilización de dientes índice (dientes de Ramfjord), debido al posible sesgo de infraestimación/sobreestimación en los resultados. Este sesgo en el registro de variables clínicas está presente en varios estudios (Katz et al. 1969, Hugoson et al. 1971, O'Neil et al. 1979, Miyazaki et al. 1991). No obstante, resultados similares se han obtenido en estudios longitudinales, donde la placa fue medida en todos los dientes presentes (Cohen et al. 1969, Chaikin et al. 1977, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002, Gürsoy et al. 2008).

Gursoy et al. (2008) obtienen una disminución decreciente de los niveles de placa desde el trimestre 1 hasta postparto (25%, 10%, 18% y 15% en trimestres 1, 2, 3 y postparto respectivamente), aunque sin diferencias significativas. El efecto Hawthorne pudo haber influido en estos resultados, aunque solo se hizo profilaxis e instrucciones de higiene oral en la primera visita. Una explicación del elevado índice de placa (VPI) en el primer trimestre puede haberse debido a las náuseas y dificultad de cepillado por este motivo. Taani et al. (2003) describió una asociación significativa entre el vómito del embarazo y el incremento de la inflamación gingival, lo cual asociaron principalmente al peor cepillado asociado al citado estado.

AUTOR, AÑO	ÍNDICE DE PLACA	GNRAL	1 TRIM.	2 TRIM.	3 TRIM.	POST-PARTO
<b>Silness &amp; Løe 1964</b>	Índice de Placa Silness & Løe 1964	0.85±0.02	0.97±0.07	0.84±0.04	0.98±0.09	0.90±0.12
<b>Cohen et al. 1969</b>	Índice irritantes duros/blandos Cohen (1969)	-	1.80±0.05	1.76±0.06	1.69±0.07	1.75±0.05
<b>Katz et al. 1969</b>	Índice de Placa Silness & Løe 1964	-	1.0	1.32	1.38	-
<b>Admas et al. 1974</b>	Debris presencia/ ausencia en sextante 2 y 5 (V)	56.1%	-	-	-	-
<b>Hugoson</b>	Índice de Placa	-	0.78	0.75	0.68	0.76

<b>1971</b>	Silness & Loe 1964					
<b>Arafat 1974</b>	Índice Higiene Oral Green & Vermillion 1960	1.01	0.86	1.01	0.99	-
<b>Samant et al. 1976</b>	Índice Higiene Oral Green & Vermillion 1960	0.8±0.04	0.72±0.06	0.99±0.08	0.69±0.08	-
<b>O'Neil 1979</b>	Índice de Placa Silness & Loe 1964	-	1.17	-	0.98	-
<b>Zaki et al. 1984</b>	Índice de placa Silness & Loe 1964	1.37±0.35	1.33±0.34	1.39±0.22	1.30±0.55	-
<b>Jonsson et al. 1988</b>	Índice dicotómico	0.52±.29	-	-	-	-
<b>Tilakaratne et al. 2000</b>	Índice de placa Silness & Loe 1964	-	0.68	0.65	0.69	0.70
<b>Yalcin et al. 2002</b>	Índice de placa Silness & Loe 1964	-	2.47±0.54	2.55±0.54	2.57±0.56	-
<b>Taani et al. 2003</b>	Índice de placa Silness & Loe 1964	-	1.84±0.1	1.88±0.06	1.95±0.05	-
<b>Gürsoy et al. 2008</b>	Índice de Placa visual (VPI)	10-7%	25%	20%	18%	15%

Tabla 8. Estimación del índice de placa por trimestres durante el embarazo según los diferentes autores.

### 1.5.7. RELACIÓN DEL EMBARAZO CON LA PERIODONTITIS

Junto con el incremento del estado inflamatorio durante el embarazo, también se ha constatado un aumento de la profundidad de sondaje (Loe & Silness 1963, Arafat et al. 1974, Samant et al. 1976, Banoczy et al. 1978). Cohen et al. (1969) realizaron una investigación con objeto de valorar si los cambios gingivales observados durante el embarazo presentaban repercusión en la inserción periodontal. Para ello, se llevó a cabo un estudio longitudinal con 20 mujeres embarazadas de menos de 20 semanas de gestación. En este estudio, aunque todas las pacientes presentaban desde el comienzo del estudio alguna forma de enfermedad periodontal, no se observó empeoramiento del status periodontal tras el embarazo, dado que los cambios inflamatorios se restringieron al componente gingival. Tras el parto, se constató la remisión parcial de la gingivitis. Miyazaki et al. (1991) confirma la aparición de pseudobolsas, observando que el grupo de mujeres embarazadas presentó mayor porcentaje de profundidades de sondaje de 4-5 mm, con un pico máximo en el octavo mes (31%) y con retorno a los valores iniciales en el noveno mes, confirmando que se trata de pseudobolsas y no de pérdida de inserción real. Sin embargo, una de las críticas principales de estos estudios yace en los índices empleados. Por un lado, Cohen et al. (1969) emplearon una modificación del índice periodontal de O'Leary, el cual no evalúa los cambios en los niveles de inserción y además combina el índice gingival y periodontal en un mismo índice, lo cual podría haber producido infra- o

sobreestimación de los niveles de enfermedad. Por otro lado, el grupo de Miyazaki (1991) emplea el CPITN, caracterizado por producir infraestimación de las formas más severas de enfermedad y sobreestimación en sujetos jóvenes, con lo que los resultados evaluados con este índice deben ser examinados con precaución (Baelum et al. 1995). El empleo de dientes índice en estos estudios también supone un sesgo metodológico.

Entre los estudios mejor diseñados metodológicamente que evalúan el efecto del embarazo sobre la inserción periodontal destaca el artículo publicado por Tilakaratne et al. (2000). En este estudio se evaluó de forma longitudinal los posibles cambios acontecidos en los niveles de inserción sobre 47 pacientes embarazadas en comparación con un grupo control de 47 mujeres no embarazadas. Para medir los niveles de inserción se empleó la sonda de presión controlada Brodentic® (Ash, Dentsply, England) en todos los dientes presentes tras realizar una calibración intraexaminador. Este estudio corrobora los resultados previamente obtenidos por otros autores en los cuales se demuestra que no aparecen cambios significativos en los niveles de inserción. Estos autores postulan que posiblemente no se produzcan cambios en el nivel de inserción debido a que 9 meses no es tiempo suficiente para que se produzcan cambios permanentes, a pesar de los efectos producidos en la barrera epitelial, vascularización y matriz del conectivo.

En la misma línea de investigación, Gürsoy et al (2008), al considerar el nivel de inserción clínico para evaluar la pérdida de inserción, corroboró que las diferencias obtenidas en la profundidad de sondaje se debieron a la aparición de pseudobolsas, en lugar de pérdida de inserción verdadera. En este estudio, el pico máximo de pseudobolsas se dio en el segundo trimestre. Tras el parto, el sangrado al sondaje y las pseudobolsas volvieron a los niveles iniciales, también en acuerdo con estudios previos (Cohen et al. 1969, Miyazaki et al. 1991, Raber-Durlacher et al. 1994, Tilakaratne et al. 2000, Taani et al. 2003).

Una posible explicación de este fenómeno es que la inflamación gingival permite una mayor penetración de la sonda en los tejidos combinado, incrementando los valores de las profundidades de sondaje (Listgarten, 1980).

#### **1.5.8. PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN LA INFLAMACIÓN GINGIVAL**

El incremento de la inflamación gingival durante el embarazo, como se ha descrito anteriormente, no es explicable solamente por la acción de la placa bacteriana. Por este motivo, las variaciones en los niveles hormonales se ha sugerido como uno de los posibles factores etiológicos responsable del

incremento de la inflamación gingival (Silness & Løe 1964, Hugoson 1970, O'Neil 1979, Raber Durlacher 1994).

Hugoson et al. (1971) evaluó el seguimiento de 26 mujeres embarazadas durante la gestación y hasta 20 semanas postparto. El análisis de regresión no encontró relación entre el índice de placa y el índice gingival, pero sí se obtuvo correlación entre el índice gingival y los niveles séricos de hormonas sexuales. Sin embargo, estos resultados deben ser evaluados con precaución, dado que los valores hormonales analizados provenían de otros artículos (control histórico). Otros autores, por el contrario, no han obtenido una correlación directa entre estos dos parámetros. O'Neil et al. (1979) rechazó esta asociación tras realizar un estudio longitudinal con 26 gestantes, concluyendo que no se pudo establecer una relación directa entre los niveles hormonales y el incremento en la inflamación gingival. Jonsson et al. (1988) corroboró estos hallazgos, ya que tampoco encontró asociación entre los cambios observados en los niveles de cortisol, progesterona, estradiol y testorenona con la inflamación gingival.

Debido a que no se ha podido demostrar una relación directa entre el incremento hormonal y la exacerbación de la inflamación gingival, el efecto hormonal es considerado de carácter indirecto.

### **1.5.9. INFLUENCIA DEL NIVEL SOCIOECONÓMICO**

Diversos estudios han evaluado la influencia de los factores socioeconómicos, demográficos y educacionales en el incremento de la inflamación gingival. Los métodos habituales empleados con mayor frecuencia para el registro de dichas variables son las entrevistas y los cuestionarios.

Machuca et al. (1999) evaluó el estado clínico periodontal de 130 embarazadas, valorando el impacto de las siguientes variables: edad, nivel profesional (trabajador manual, empleado, trabajos especializados, profesiones liberales, ama de casa), nivel educacional (sin estudios, estudios de primaria, estudios de secundaria y estudios superiores), mantenimiento periodontal previo (frecuente / infrecuente) y lugar de residencia (rural / urbano). El sangrado al sondaje medio obtenido fue del 68,8%. Estuvo significativamente relacionado con un nivel profesional bajo, atención dental infrecuente y residencia rural. El índice de placa medio fue del 58.7% (Índice de O'Leary), el cual también estuvo significativamente asociado a un nivel profesional bajo, nivel educacional inferior, tratamiento periodontal infrecuente y vivir en poblaciones rurales.

En un estudio realizado en Estambul, Yalcin et al. (2002) confirman los resultados previamente obtenidos por Machuca et al. (1999). Mediante un análisis de regresión concluyeron que el nivel educacional y el tratamiento dental previo resultaron significativamente relacionados con las variables

clínicas. De nuevo, en esta población predominaba un nivel socioeconómico y educacional bajo. Taani et al. (2003) evaluaron la influencia de las características sociodemográficas en el status periodontal sobre un grupo de 200 mujeres embarazadas y 200 no embarazadas. Los resultados de este estudio corroboran que el nivel educacional y la ausencia de trabajo empeoran la inflamación gingival de las pacientes gestantes. La asociación entre la falta de empleo y la inflamación gingival se debe al bajo nivel socioeconómico, educacional e inaccesibilidad al tratamiento dental. En este estudio también influyeron otras variables como la edad y ser mujer múltipara. La asociación entre mujeres múltiparas y aumento del índice gingival y profundidad de sondaje está en acuerdo con otros autores (Raber-Durlacher 1994). Puede explicarse porque estas mujeres no recibieron tratamiento dental tras el embarazo y lo arrastraron al siguiente embarazo (Persson et al., 2009). Además, estas mujeres eran de bajo nivel socioeconómico y educacional, con poca atención al cuidado personal.

#### **1.5.10. OTRAS VARIABLES INVOLUCRADAS EN LA INFLAMACIÓN GINGIVAL DE LA GESTANTE**

Se ha descrito una asociación significativa entre las náuseas presentes en el embarazo y el incremento de la inflamación gingival. Esta asociación se atribuye por el incremento en los depósitos de placa bacteriana, debido por un lado a la disminución de la frecuencia de cepillado y por otro debido a la inducción del vómito que produce la acción de cepillado *per sé* (Taani et al. 2003)

Durante el embarazo, existen alteraciones en la psicología y comportamiento, con tendencia a descuidar la higiene personal (Ferris et al. 1993, Porter et al. 1994). Se deduce por lo tanto la importancia de los programas educacionales para prevenir problemas periodontales en el embarazo.

#### **1.5.11. SEGOS PLAUSIBLES PRESENTES EN LA LITERATURA**

La comparación de datos entre los diferentes artículos se dificulta por la gran heterogeneidad en el diseño de los diferentes estudios. A continuación se describen las dificultades existentes:

- Gran parte de los estudios publicados son transversales, lo cual dificulta evaluar la relación entre embarazo y cambios periodontales (Løe & Silness 1963, Silness & Løe 1964, Katz et al. 1969, Arafat 1971, Adams et al. 1974, Samant et al. 1976, Conde et al. 1981, Zaki et al. 1984, Jonsson et al. 1988, Miyazaki et al. 1991, Muramatsu & Takaesu 1994, Kraivaphan et al. 2006, 2007, Acharya 2009). Los estudios longitudinales ofrecen un mejor control de los factores de confusión (Stroup et al., 2000).
- Diversos estudios previos no contemplaron factores de confusión en el análisis de resultados, como embarazos previos, empleo de anticonceptivos, factores sistémicos o



tabaco, lo cual podría haber afectado los resultados obtenidos.

- Varios artículos encuentran el índice de placa del grupo embarazo mayor al del grupo control, lo cual dificulta la comparación entre grupos al no ser homogéneos (Katz et al. 1969, Samant et al. 1976, Yalcin et al. 2002).
- El registro de variables se realiza en dientes índice por varios autores, lo cual no estima de forma adecuada la variable respuesta por infra- o subestimación de las mediciones (Silness & Løe 1963, 1964, Katz et al. 1969, Hugoson 1971, Adams et al. 1974, O'Neil 1979, Cerná et al. 1988, Acharya et al. 2009), o no especifican los dientes incluidos en el análisis (Conde et al. 1981, Zaki et al. 1984).
- Se han empleado diferentes índices e instrumental de medición. La ausencia de estandarización en el diseño y metodología dificulta la comparación entre estudios.
- Las poblaciones incluídas en los diferentes estudios no son homogéneas, lo cual dificulta la comparación de resultados.

# ANEXO ÍNDICES DE PLACA

A continuación se desarrollan los índices de placa empleados en la literatura para el registro de los depósitos bacterianos sobre las superficies dentarias:

## 1. INDICE DE CÁLCULO, RAMFJORD (1959)

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	No cálculo
1	Cálculo supragingival que no se extiende más de 1 mm subgingival.
2	Cantidad moderada de cálculo supra- y subgingival, o solamente subgingival.
3	Cálculo supra- y subgingival abundante.

Dientes evaluados: Dientes de Ramfjord.

Superficies evaluadas: vestibular, mesial, distal e interproximal.

Puntuación: 0-3.

Método: el índice de cálculo de (i) un diente, (ii) un grupo de dientes y (iii) del paciente se calcula haciendo puntuación media de superficies.

## 2. INDICE DE HIGIENE ORAL, GREEN Y VERMILLION (1960)

### INDICE DE CÁLCULO

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Sin cálculo presente.
1	Cálculo supragingival que cubre menos de 1/3 de la corona clínica.
2	Cálculo supragingival que cubre entre 1/3 - 2/3 de la corona clínica, o presencia de cálculo incipiente subgingival.
3	Cálculo supragingival que cubre más de 2/3 de la corona clínica, o presencia cálculo abundante subgingival

### INDICE DE DEBRIS

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Sin depósitos blandos/debris presente.
1	Depósitos blandos cubriendo menos de 1/3 de la corona clínica, o tinciones extrínsecas.
2	Depósitos blandos cubriendo entre 1/3 – 2/3 de la corona clínica
3	Depósitos blandos cubriendo más de 2/3 de la corona clínica.

### 3. INDICE DE PLACA DE SILNESS & LÖE (1964).

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	No placa
1	Presencia de una fina capa de placa adherida al margen gingival libre. La placa solo puede ser visualizada empleando revelador de placa o con el paso de la sonda sobre la superficie dentaria.
2	Acumulación moderada de depósitos blandos en la bolsa periodontal o sobre la superficie del diente y margen gingival que puede ser valorado mediante inspección visual.
3	Depósitos blandos abundantes en la bolsa periodontal y/o diente y margen gingival.

Dientes evaluados: Dientes de Ramfjord.

Superficies evaluadas: vestibular, mesial, distal e interproximal.

Puntuación: 0-3.

Método: el índice de cálculo de (i) un diente, (ii) un grupo de dientes y (iii) del paciente se calcula haciendo puntuación media de superficies.

### 4. INDICE DE IRRITANTES DUROS Y BLANDOS DE COHEN (1969)

DEPÓSITOS DUROS	CRITERIOS
H-0	No existe rugosidad detectable en la superficie MV del diente
H-1	Rugosidad detectable < 1 mm apical al margen gingival
H-2	Rugosidad detectable > 1 mm apical al margen gingival
DEPÓSITOS BLANDOS	CRITERIOS
S-0	No hay tinción
S-1	Tinción < 2 mm coronal al margen gingival
S-2	Tinción > 2 mm coronal al margen gingival

Empleo de revelador de placa para el índice de depósitos blandos.

Superficies evaluadas: vestibular y lingual.

### 5. INDICE DE PLACA DE O'LEARY (1972)

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Ausencia de placa bacteriana
1	Presencia de placa bacteriana

Índice de placa dicotómico.

Superficies evaluadas: mesial, distal, vestibular y lingual.

Método: se calcula el número de áreas sin placa respecto al número total de áreas evaluadas, obteniendo el porcentaje de placa total.

## 6. INDICE DE PLACA VISIBLE (VPI) GURSOY (2008)

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Ausencia de placa bacteriana visible
1	Presencia de placa bacteriana visible

- BoP (B) 0-2.
  - (0) No sangrado
  - (1) fina línea de sangrado
  - (2) sangrado profuso.

## ANEXO ÍNDICES GINGIVALES/PERIODONTALES

A continuación se desarrollan los índices de placa empleados en la literatura para el registro de los depósitos bacterianos sobre las superficies dentarias:

### 1. INDICE PERIODONTAL DE RUSSELL (1956).

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	NEGATIVO. No existe evidencia de inflamación en los tejidos ni pérdida de función como consecuencia de la destrucción de los tejidos de soporte.
1	GINGIVITIS LEVE. Existe un área de inflamación sobre la encía libre, pero no circumscribe todo el diente.
2	GINGIVITIS. La inflamación circumscribe todo el perímetro del diente, pero sin alteraciones en la inserción epitelial.
6	GINGIVITIS CON FORMACIÓN DE BOLSAS. Se ha producido disrupción de la inserción epitelial con formación de bolsa periodontal. No hay interferencia con la función masticatoria normal.
8	DESTRUCCIÓN AVANZADA CON PÉRDIDA DE LA FUNCIÓN MASTICATORIA. El diente puede perderse, intrusión en el alveolo dentario.

Método: cada diente se evalúa en una escala de 0-8 según los signos clínicos de periodontitis descritos. El índice individual de un paciente se calcula como la media de la puntuación de todos los dientes presentes.

Diagnóstico clínico:

- Gingivitis: Puntuación 0.1-2.0.
- Enfermedad destructiva (reabsorción de hueso alveolar y bolsas periodontales): Puntuación 1.5-5.0.
- Enfermedad destructiva tan avanzada que interfiere con la función: Puntuación 4.0 -8.0.

### 2. INDICE GINGIVAL (GI). LÖE & SILNESS, 1963.

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Ausencia de inflamación.
1	Inflamación leve. Ligero cambio en color y textura gingival.
2	Inflamación moderada. Enrojecimiento, edema, hipertrofia.
3	Inflamación severa. Hipertrofia y enrojecimiento muy marcado. Ulceración. Sangrado espontáneo.

Método: se evalúan 6 dientes, representando los 6 sextantes y los 3 grupos de dientes (incisivos, premolares, molares): 16, 12, 24, 36, 32, 44. El *GI* de cada diente se calcula haciendo la media. El *IG* de cada grupo de dientes (I, PM, M) y el *GI* del paciente también se calculan haciendo las medias respectivas.

Puntuación: 0-3.

Superficies evaluadas: vestibular, mesial, distal e interproximal.

### 3. MODIFICACIÓN DEL ÍNDICE PERIODONTAL DE O'LEARY (COHEN, 1969)

ÍNDICE GINGIVAL	CRITERIOS
G-0	No existen cambios inflamatorios gingivales
G-1	Cambios inflamatorios leves que no rodean todo el diente.
G-2	Cambios inflamatorios leves presentes en vestibular y lingual.
G-3	Presencia de ulceraciones, sangrado espontáneo o pérdida del contorno gingival.
G-4	Recesión V y/o lingual
ÍNDICE PERIODONTAL	CRITERIOS (evaluado en línea ángulo mesial con sonda Michigan modificada)
P-0	La sonda penetra < 1 mm apical al LAC
P-4	La sonda penetra 1-3 mm respecto al LAC
P-5	La sonda penetra 3-6 mm respecto al LAC
P-6	La sonda penetra ≥ 6 mm apical al LAC

El índice gingivo-periodontal se obtiene con la máxima puntuación del diente. Si un diente presenta tanto índice periodontal como gingival, se empleará el índice periodontal.

### 4. ÍNDICE DE GINGIVITIS DE CHAIKIN (1977)

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
L / M / S	Gingivitis papilar
L / M / S	Gingivitis marginal
L / M / S	Gingivitis alveolar

Graduada en: leve (L), moderada (M) y severa (S).

### 5. CPITN (AINAMO 1982, CUTRESS 1987).

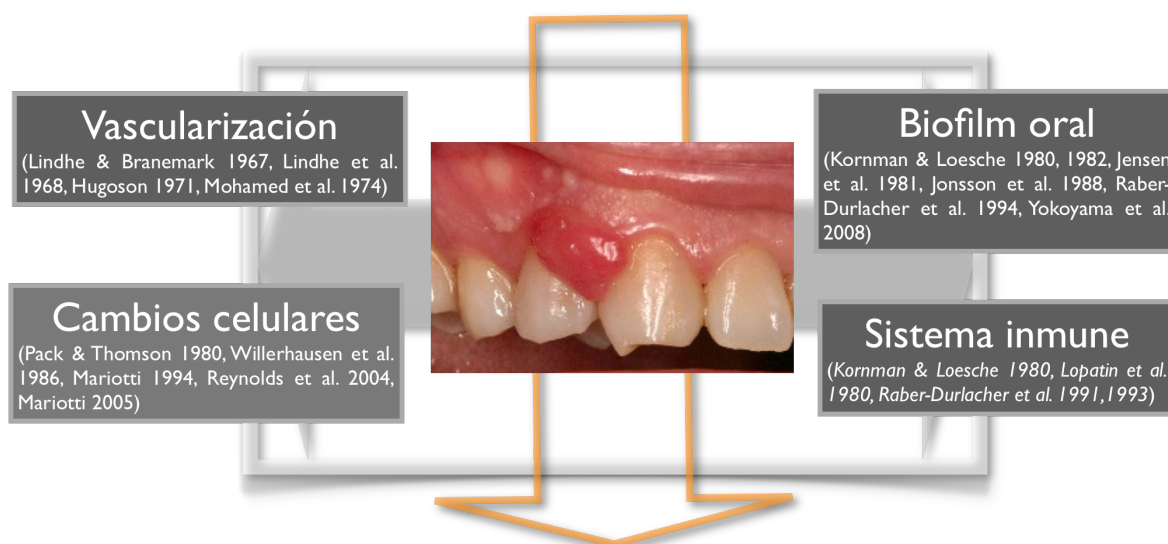
PUNTUACIÓN	CRITERIOS
Código 4	PS ≥ 6 mm
Código 3	PS 4-5 mm
Código 2	Cálculo supra o subgingival
Código 1	Sangrado al sondaje
Código 0	No signos de enfermedad

10 dientes índice/6 sextantes

### 1.6.1. INTRODUCCIÓN

La homeostasis del periodonto puede verse afectada por múltiples factores capaces de modificar la expresión clínica de la gingivitis inducida por placa, incluyendo las variaciones en los niveles hormonales (Armitage, 1999). Los estudios clínicos han descrito un incremento transitorio en la incidencia y severidad de la inflamación gingival durante el embarazo, no relacionado con cambios en los niveles de placa presentes (Silness & Løe 1964, Hugoson 1971, Tilakaratne et al. 2000).

### ALTERACIONES HORMONALES



### INFLAMACIÓN GINGIVAL

Fig. 2. Mecanismos etiopatogénicos de la gingivitis del embarazo.

Durante el embarazo, se produce un incremento de la respuesta del tejido periodontal ante la agresión bacteriana, dado que las hormonas sexuales son un condicionante necesario pero no suficiente para producir los cambios inflamatorios gingivales (Arafat 1974, Chaikin 1977). Por lo tanto, la gingivitis del embarazo se produce como consecuencia de un desequilibrio entre el balance huésped y la agresión bacteriana (Kornman and Loesche, 1980, Raber-Durlacher et al., 1993).

Se han propuesto diferentes hipótesis etiológicas para tratar de explicar los cambios gingivales observados durante el embarazo, aunque los resultados no son concluyentes. Existen cuatro posibles

mecanismos etiopatogenicos diferentes, que incluyen: (i) cambios vasculares (Lindhe and Branemark, 1967a, Lindhe and Branemark, 1967b, Lindhe and Branemark, 1968, Lindhe et al., 1967, Hoffman et al., 1981); (ii) cambios celulares (Dyer et al., 1980, Mariotti, 2005); (iii) cambios en el sistema inmunitario (O'Neil, 1979a, Lopatin et al., 1980, Miyagi et al., 1993, Raber-Durlacher et al., 1993, Lapp and Lapp, 2005) y cambios microbiológicos (Kornman and Loesche, 1980, Jensen et al., 1981, Raber-Durlacher et al., 1994) (Fig. 2). Diferentes estudios han sido publicados al respecto, aunque probablemente la respuesta del periodonto no es debida a un solo mecanismo, sino que sea de naturaleza multifactorial (Mariotti 1994). La evaluación simultánea de los diferentes factores potenciales permitiría un mejor entendimiento de esta endocrinopatía.

### 1.6.2. CAMBIOS VASCULARES

Potencialmente, los efectos de estrógenos y progestágenos sobre el sistema vascular podrían localmente explicar el incremento gingival del edema, eritema, exudado crevicular gingival y sangrado observado durante el embarazo, así como durante determinadas fases del ciclo reproductivo. El aumento de la tasa de fluido crevicular gingival ha sido previamente correlacionado con el incremento en los niveles de hormonas sexuales lo cual indica que las hormonas sexuales pueden afectar a la permeabilidad vascular (Hugoson, 1970).

En la mujer, la principal hormona sexual reponsable de los cambios acontecidos en el sistema vascular sobre los órganos diana son los estrógenos. Por el contrario, los efectos de la progesterona son limitados (Magness et al. 2001). En el caso de los tejidos periodontales, esta situación es revertida, ya que la evidencia acumulada sobre la progesterona es mayor en comparación con los efectos inducidos por los estrógenos sobre la vascularización local. La progesterona ha mostrado la capacidad de reducir el volumen corpuscular medio, permitiendo la acumulación de células inflamatorias (Lindhe and Branemark, 1967a), incrementar la permeabilidad vascular (Hugoson, 1970, Lindhe and Branemark, 1967b) e incrementar la proliferación vascular (Lindhe et al., 1967). En estos estudios, los estrógenos mostraron tener efectos mínimos sobre la vascularización gingival. Sin embargo, estos resultados deben evaluarse con precaución, dado que se utilizaron dosis farmacológicas extremadamente elevadas y modelos animales. En el caso del ligamento periodontal, las células componentes han mostrado reactividad frente a los receptores estrogénicos beta (*RE beta*), mientras que no mostraron inmunoreactividad para receptores de progesterona, lo cual implica que la progesterona no ejerce un efecto directo sobre la función celular del ligamento periodontal (Jonsson, 2007).



A tenor de lo expuesto previamente, son necesarios más estudios que evalúen localmente el efecto de las hormonas sexuales sobre el sistema vascular del periodonto y su relación con el incremento de la inflamación gingival observado durante el embarazo.

### **1.6.3. INFLUENCIA HORMONAL SOBRE LAS CÉLULAS DEL PERIODONTO**

Los efectos ejercidos por las hormonas sexuales sobre las diferentes estirpes celulares componentes del periodonto es otro de los factores que podrían repercutir en la inflamación gingival presentada durante el embarazo, aunque la evidencia disponible es también limitada.

A nivel sistémico, las hormonas sexuales esteroideas ejercen su acción, tanto de forma directa como indirecta, sobre la proliferación, diferenciación y crecimiento celular en los órganos diana. A nivel oral, estrógenos, progestágenos y andrógenos también han demostrado ser capaces de influir sobre distintas estirpes celulares, siendo los fibroblastos y queratinocitos los más estudiados (Mariotti, 1994).

Los estrógenos han demostrado estimulan la proliferación epitelial e incrementar la queratinización de la mucosa vaginal (Amar and Chung, 1994). Este efecto hormonal también ha sido corroborado sobre la mucosa oral y el epitelio gingival. En mujeres post-menopáusicas se ha observado que el descenso en los niveles plasmáticos de estrógenos es concomitante a la reducción en la queratinización del epitelio gingival (Trott & Banoczy 1962).

Mariotti (2005) evaluó *in vitro* el comportamiento de los fibroblastos gingivales de mujeres sanas jóvenes pre-menopáusicas mediante la incubación de los mismos en presencia o ausencia de concentraciones fisiológicas de estradiol. Observó que la adición de estradiol indujo la proliferación celular y el incremento de células entrando en fase de síntesis (S) de duplicación de ADN del ciclo celular, mientras que la producción de proteínas colágenas y no colágenas se redujo. Efectos similares respecto a la reducción en síntesis proteica se han observado en las células del ligamento periodontal, constatando una reducción en la síntesis de colágenos por los fibroblastos. Los fibroblastos derivados del ligamento cruzado anterior también han demostrado reducción dosis-dependiente de la síntesis de pro-colágenos ante concentraciones tisulares de estradiol (Liu et al. 1997). El resultado de la reducción en la síntesis proteica es la reducción del potencial de mantenimiento y reparación tisular (Mariotti 2005).

Las hormonas ováricas han demostrado ser capaces de influir de manera dinámica sobre la matriz extracelular gingival, efectos que pueden resultar alterados durante etapas de fluctuaciones hormonales (Lundgren et al. 1973). Las hormonas sexuales también han demostrado la capacidad de incrementar la tasa del metabolismo de los folatos sobre la mucosa oral (Pack & Thomson 1980). Los folatos representan un elemento indispensable para el mantenimiento tisular. El incremento del metabolismo tisular podría provocar déficit en las reservas de folatos e inhibir la reparación tisular. La progesterona también ha demostrado disminuir la síntesis de glicosaminoglicanos, constituyente de la matriz del tejido conectivo gingival (Willershausen-Zonnchen et al., 1991).

En resumen, la evidencia disponible sugiere que las hormonas sexuales contribuyen en los procesos de mantenimiento y reparación del tejido gingival. En consecuencia, esta interacción puede potencialmente contribuir al incremento de la inflamación durante el embarazo. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder dilucidar los mecanismos precisos que interfieren sobre dichos procesos.

#### **1.6.4. CAMBIOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO**

Según la hipótesis inmunológica, los cambios sistémicos desarrollados en el sistema inmunitario para permitir la tolerancia fetal repercuten en cambios en el sistema defensivo de los tejidos periodontales. De esta manera, se produce una alteración en la resistencia del periodonto ante la agresión bacteriana e incrementa por consiguiente la inflamación gingival (O'Neil, 1979a, Lopatin et al., 1980, Raber-Durlacher et al., 1991).

La susceptibilidad a las infecciones incrementa durante el período de gestación (Brabin, 1985), tales como la infección por *Helicobacter pilori* (Lanciers et al., 1999), *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* e infecciones virales (*virus herpes y papilomavirus*) (Priddy, 1997). Para explicar este fenómeno se han propuesto varias teorías. A nivel sistémico, la respuesta materna inmunitaria durante un embarazo normal parece estar asociada a una alteración del balance Th1/Th2. Se produce un incremento de la inmunidad humoral, protectora para el feto, (respuesta Th2; IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), mientras que la inmunidad mediada por células disminuye (respuesta Th1; IL-2, IL-3, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ ) (Szekeres-Bartho, 2002, Shiau and Reynolds).

Algunos autores han descrito una reducción en la respuesta T-linfocitaria frente a la estimulación antigénica (O'Neil, 1979a, Lopatin et al., 1980, Polan et al., 1990), mientras que otros autores descartan esta hipótesis (Raber-Durlacher et al., 1991). No obstante, estos resultados deben ser evaluados con precaución dado que la metodología empleada en estas investigaciones clásicas se basa en la estimulación *in vitro* de linfocitos periféricos o monocitos de mujeres embarazadas con mitógenos. También se ha descrito una disminución de la quimiotaxis de neutrófilos y de la actividad

fagocitaria (Raber-Durlacher et al., 1991, Raber-Durlacher et al., 1993, Zachariasen, 1993). El estrés materno es un factor adicional que parece influir negativamente sobre el sistema inmunitario (Culhane et al., 2001).

#### **1.6.4.1. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN**

La repercusión de los cambios inmunológicos sobre el periodonto ha sido analizada a través del estudio de diferentes mediadores de la inflamación. Bajo esta hipótesis, los cambios inmunomoduladores sistémicos asociados al embarazo pueden potencialmente influir en los mecanismos defensivos locales del periodonto, modificando de este modo la respuesta a la agresión bacteriana e incrementando por consiguiente la inflamación gingival como consecuencia de la alteración de la capacidad defensiva (Tabla 9).

El incremento de PGE2 como consecuencia de la acción estimulante de las hormonas sexuales se ha propuesto como una posible explicación etiopatogénica de la exacerbabción de la inflamación gingival durante el embarazo (Sooriyamoorthy and Gower, 1989, Mascarenhas et al., 2003, Mealey and Moritz, 2003). Varios estudios *in vitro* han mostrado que progesterona y estradiol son capaces de inducir e incrementar la producción de prostaglandina E2 (PGE2). ElAttar et al. (1976) analizaron biopsias de tejido gingival sano incubadas con estradiol y progesterona, observando un incremento de la síntesis de PGE2. Miyagi et al. 1993 realizaron la incubación de monocitos, obtenidos de sangre periférica de adultos sanos, con progesterona y estradiol junto con la adición de lipopolisacáridos de origen bacteriano (LPS). Tras realizar la incubación, observaron que la producción de PGE2 se incrementaba mediante la adición de progesterona. En el caso del estradiol, el tratamiento con 0.4 ng/ml redujo la síntesis de PGE2, aunque al añadir prostaglandina incrementó su síntesis. Ante concentraciones de 20 ng/ml de estradiol, la expresión de PGE2 se vio incrementada sin necesidad de progesterona. Respecto a estudios en humanos, Yalcin et al. (2002) observaron que los niveles en fluido crevicular gingival (FCG) de PGE2 en mujeres embarazadas con periodontitis disminuyeron tras realizar tratamiento periodontal. Los autores concluyeron que los niveles de PGE2 en FCG podrían utilizarse como marcador de la inflamación gingival, aunque el estudio presenta la limitación de falta de grupo control.

La interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es una potente citokina pro-inflamatoria implicada en la inflamación periodontal, tanto aguda como crónica, así como en la reabsorción ósea (Silva et al., 2008, Polak et al., 2009, Ren et al., 2009, Vernal et al., 2009). IL-1 $\beta$  estimula la producción de interleukina 6 (IL-6) y PGE2 (Saito et al. 1990), mientras que PGE2 ejerce un efecto supresor sobre esta citokina (Rocklin et al. 1980). Estudios *in vitro* han mostrado que las hormonas sexuales (progesterona y estradiol) ejercen un efecto supresor sobre la síntesis de IL-1 $\beta$  tras la adición de lipopolisacáridos de origen bacteriano (Morishita et al., 1999a). Polan et al (1990) observaron que los monocitos periféricos

aislados durante el primer trimestre del embarazo vieron reducida la síntesis de IL-1 $\beta$  (7 UI/ml) en comparación con monocitos aislados en un grupo de mujeres durante la fase lútea (52.4 UI/ml).

La interleukina 6 (IL-6) es una citokina pleiotrópica pro-inflamatoria cuya relación con las hormonas sexuales es contradictoria. Determinados estudios *in vitro* han mostrado que la estimulación con hormonas sexuales produce una reducción en la producción de IL-6, sosteniendo la hipótesis de reducción de la resistencia del periodonto frente a la agresión bacteriana e incrementando así, por consiguiente, la inflamación gingival (Lapp et al., 1995, Lapp and Lapp, 2005, Gornstein et al., 1999, Carrillo-de-Albornoz et al.). Por el contrario, otros estudios han observado que la producción de IL-6 se incrementa tras la estimulación con estradiol o progesterona (Yokoyama et al., 2008). En los estudios clínicos, los niveles de IL-6 parecen estar relacionados con la condición periodontal de la gestante. Offenbacher et al. (2006) concluye que los niveles de IL-6 en FCG se reducen significativamente en pacientes embarazadas con periodontitis que reciben tratamiento periodontal frente al grupo control que no recibe tratamiento. En pacientes con gingivitis, los niveles de IL-6 en FCG son significativamente superiores al grupo de pacientes periodontalmente sanas, durante todas las fases del ciclo menstrual (Becerik et al. 2010).

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) es otra citokina pro-inflamatoria posiblemente afectada por las variaciones hormonales asociadas al embarazo. La deficiencia de estrógenos asociada a la menopausia ha demostrado incrementar la producción de TNF- $\alpha$  por las células T, sosteniendo el concepto de la disminución de la respuesta Th1 durante el embarazo. Sin embargo, modelos animales han mostrado que la infección localizada con *Porphyromonas gingivalis* en ratones gestantes dispara la cascada inflamatoria con incremento de niveles séricos de TNF- $\alpha$  (Lin et al., 2003, Collins et al., 1994).

AUTOR, AÑO	MED.	MATERIAL Y MÉTODO	RES.	RESULTADOS
<b>ElAttar, 1976</b>	PGE2	<i>In vitro</i> Biopsias humanas incubadas con estradiol y progesterona. - 12 pacientes encía sana - 24 pacientes inflamación gingival	+	La adición de estradiol y progesterona incrementó la síntesis de PGE2
<b>Miyagi et al. 1993</b>	PGE2	<i>In vitro</i> Linfocitos periféricos de hombres y mujeres no embarazadas estimulados con LPS, estradiol y progesterona. - 8 hombres - 8 mujeres	+	- Progesterona: Incrementó la síntesis de PGE2. - Estradiol: A 0.4 ng/ml redujo la síntesis PGE2. Se potenció con adición de progesterona. A 20 ng/ml incrementó la síntesis de PGE2.
<b>Yalcin et al. 2002</b>	PGE2	Evaluación de PGE2 en FCG pre- y post tratamiento periodontal en una cohorte de mujeres embarazadas con periodontitis. - 22 embarazadas 1 trimestre.	-	El tratamiento periodontal produjo mejoría de los parámetros clínicos y disminución de PGE2 en segundo y tercer trimestres.
<b>Polan et al. 1990</b>	IL-1 $\beta$	<i>In vitro</i> Linfocitos periféricos de mujeres estimulados con LPS, estradiol y progesterona. - 6 embarazadas (trimestres 2 y 3). - 8 mujeres fase lútea.	-	La secreción de IL-1 $\beta$ por monocitos fue menor durante el embarazo (52.4 UI/ml) en comparación con la fase lútea (7 UI/ml).
<b>Morishita et al. 1999</b>	IL-1 $\alpha$ , $\beta$	<i>In vitro</i> Linfocitos periféricos de adultos sanos estimulados con LPS, estradiol y progesterona. - 11 hombres - 11 mujeres	-	- Progesterona: Inhibió la producción de IL-1 $\alpha$ a concentraciones $\geq 0.1$ ng/ml, y de IL-1 $\beta$ a $\geq 0.02$ ng/ml. - Estradiol: Inhibió la producción de IL-1 $\alpha$ , $\beta$ a concentraciones $\geq 0.04$ ng/ml.
<b>Lapp et al. 1995</b>	IL-6	<i>In vitro</i> Cultivo de fibroblastos obtenidos de biopsias de tejido incubadas con progesterona	-	La producción de IL-6 con progesterona se redujo del 40-60% respecto a control.
<b>Telleria et al. 1998</b>	IL-6	<i>Experimentación animal</i> PCR para evaluar la expresión de IL-6 en el cuerpo lúteo de ratones gestantes.	-	Progesterona y dexametasona inhibieron la expresión de IL-6, mientras que el efecto inhibitorio de 17 $\beta$ estradiol fue mínimo. La expresión de IL-6 mRNA incrementó con la inyección de endotoxina bacteriana (LPS).
<b>Gornstein et al. 1999</b>	IL-6	<i>In vitro</i> Cultivo de fibroblastos obtenidos de biopsias de tejido incubadas con testosterona y dihidrotestosterona	-	Testosterona y dihidrotestosterona inhibieron la producción de IL-6 por fibroblastos gingivales
<b>Lapp &amp; Lapp. 2005</b>	392 genes	<i>In vitro</i> Macroarray para evaluar la expresión génica de 392 genes por fibroblastos con IL-1 $\beta$ o bien IL-1 $\beta$ + progesterona /17 $\beta$ estradiol	-	Numerosos genes cuya expresión se potencia con IL-1 $\beta$ , la adición de progesterona/estradiol disminuyó la expresión.

<b>Cohen-Solal et al., 1993</b>	IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$	<i>In vitro</i> Linfocitos periféricos de mujeres estimulados con LPS. - 13 mujeres pre-menopausia - 21 menopausia sin tratamiento hormonal. - 14 menopausia con tratamiento estrógenos	-	Las mujeres tratadas con estrógenos presentaron concentraciones menores de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ .
<b>Lin et al., 2005</b>	TNF $\alpha$ , IL - 2, IL - 4, IL - 6, IL-10 IFN $\gamma$	<i>Experimentación animal</i> Exposición de Pg en ratones gestantes con modelo de cámara subcutánea. PCR. - 20 ratones inóculo Pg - 8 ratones inóculo control	+	El grupo inóculo P.gingivalis: TNF- $\alpha$ . Incremento ES. IL-10. Descenso ES. IL-6. Tendencia a incremento. El 40% de los fetos inoculados con Pg presentaron bajo peso.
<b>Michalowicz et al. 2006</b>	PGE2 MMP-9 CRP IL-1 $\beta$ IL-6 IL-8 TNF- $\alpha$	RCT 823 embarazadas < 21s con periodontitis. Tratamiento periodontal (test) y sin tratamiento (control). Evaluación de niveles sistémicos de biomarcadores.	/	El tratamiento periodontal no quirúrgico no produjo cambios en ninguno de los mediadores de la inflamación evaluados (en suero). No hay análisis del FCG.
<b>Offenbacher et al. 2006</b>	IL-1 $\beta$ PGE2 IL-6 TNF- $\alpha$ 8-ISO	RCT Tratamiento periodontal (test) y sin tratamiento (control). Evaluación de biomarcadores en FCG.	+	- Sin tratamiento periodontal: Aumento IL-1 $\beta$ e IL-6 - Con tratamiento periodontal: Disminución IL-6sr en suero e IL-1 $\beta$ en FCG

Tabla 9. Análisis de los mediadores de inflamación en el periodonto durante el embarazo.

### 1.6.5. CAMBIOS EN EL BIOFILM SUBGINGIVAL

Estudios clásicos (Løe et al. 1965; Theilade et al. 1966) han demostrado que la acumulación bacteriana induce de manera reproducible una respuesta inflamatoria en los tejidos gingivales adyacentes. Del mismo modo, la eliminación de los depósitos bacterianos se asocia a la desaparición de los signos de inflamación. La placa bacteriana ha demostrado ser factor etiológico no sólo de patología gingival, siendo también factor principal asociado de periodontitis e infecciones periimplantarias (Lindhe & Nyman 1975, Nyman et al. 1977, Axelsson & Lindhe 1981, Rosling et al, 1976, Becker et al. 1979, 1984, Pontoriero et al. 1994).

#### 1.6.5.1. LA PLACA BACTERIANA COMO BIOFILM

El concepto clásico de placa bacteriana se ha redefinido con el concepto de biofilm, en el cual las bacterias presentes no se encuentran de manera aleatoria, sino que habitan de manera estructurada y organizada con una arquitectura consecuente con las necesidades de la microbiota. Se define como el conjunto de comunidades bacterianas íntimamente asociadas que se adhieren tanto a superficies naturales como artificiales. Generalmente se asocian a ambientes acuáticos con una concentración de nutrientes necesaria para mantener las necesidades metabólicas de la comunidad bacteriana (Costerton, 1995).

En la última década, el conocimiento acerca del biofilm ha cambiado radicalmente gracias al desarrollo de nuevas tecnologías aplicables a este campo. Estas técnicas comprenden la aplicación no invasiva del microscopio (ej. Microscopía láser confocal), la publicación de genomas microbianos (permiten la comparativa de genomas, transcriptómica y proteómica) y desarrollo de herramientas moleculares. Estas técnicas han demostrado que los biofilms son comunidades altamente estructuradas, con canales que atraviesan la estructura para permitir el intercambio de nutrientes entre bacterias mediante sistemas circulatorios (Costerton et al. 1995). Las especies componentes no se distribuyen de manera aleatorizada, sino que se disponen espacial y funcionalmente de forma organizada, con una elevada biodiversidad bacteriana.

La expresión génica varía respecto a la forma planctónica cuando las células forman parte del biofilm, resultando en un comportamiento fenotípico completamente diferente. Se ha propuesto que la heterogeneidad ambiental desarrollada en los biofilms puede acelerar la diversidad fenotípica y genotípica en las poblaciones bacterianas, constituyendo un mecanismo que protege a las células de propiedades ambientales adversas (Boles et al. 2004).

La maduración del biofilm provoca una síntesis continua de exopolímeros que forman la matriz extracelular. La matriz cumple una doble función: estructural de andamiaje y por otro lado actúa como retención de nutrientes, agua y enzimas clave dentro del biofilm (Allison 2003, Branda et al. 2005). Dentro de la comunidad bacteriana que conforma el biofilm existen sofisticados sistemas de comunicación célula-célula empleados por las bacterias para coordinar la expresión génica. Las bacterias Gram positivas generalmente se comunican a través de pequeños péptidos difundibles (Sturtevant et al. 2002), mientras que las Gram negativas secretan ácidos homoserina lactonas (AHLs) (Whitehead et al. 2001), cuya estructura varía en función de la especie bacteriana que lo produzca. AHLs están involucradas en el *quorum sensing* para el control de la densidad celular. Los cambios en la expresión génica facilitan a las bacterias el crecimiento y supervivencia en el biofilm. En esta línea de investigación se están sintetizando análogos a las moléculas de señalización interbacteriana para manipular las propiedades del biofilm (Stewart & Costerton 2001).

El estilo de vida en comunidad aporta un enorme potencial a las células participantes de comunidad bacteriana:

- Heterogeneidad fisiológica. Las bacterias se adaptan a un amplio rango de hábitats en los que pueden sobrevivir. El metabolismo de los colonizadores iniciales altera el ambiente local, haciendo las condiciones más favorables para nuevos colonizadores potencialmente más agresivos para el huésped. De esta manera, la diversidad de la microbiota varía conforme madura la comunidad.
- Incremento del potencial metabólico y eficiencia.
- Incremento de la resistencia al estrés ambiental, agentes antimicrobianos y defensa del huésped. Las bacterias son más resistentes a agentes antimicrobianos en el biofilm, pero además este efecto se potencia por otras especies bacterianas que pueden producir enzimas neutralizantes ( $\beta$ -lactamasa, IgA proteasa, etc), protegiendo a especies inherentemente susceptibles (Brook 1989). Otros mecanismos de defensa son la transferencia horizontal de genes y la protección física a la fagocitosis en las capas profundas.
- Capacidad de potenciar el daño causado al huésped

A partir de los estudios sobre las propiedades bacterianas y factores de adherencia se ha propuesto una secuencia de sucesión bacteriana para la formación del biofilm (Kolenbrander et al 1999):

- Película adquirida. Deriva de secreciones del huésped. Está compuesta por productos derivados de la saliva (proteínas ricas en prolina, amilasa, glicoproteínas, mucinas, etc.), restos celulares de otras bacterias y productos de origen bacteriano. Precede y sirve de adherencia a los primeros colonizadores bacterianos.
- Fase 1. Destacan los estreptococos como colonizadores iniciales (47-82%). *Streptococcus* viridans han demostrado su capacidad de adherirse a hidroxiapatita cubierta por saliva.
- Fase 2. Tras los colonizadores iniciales aumenta la complejidad del biofilm. Entre los colonizadores secundarios encontramos los géneros *Actinomyces*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus* y *Capnocytophaga*.
- Fase 3. Destaca la co-adhesión del anaerobio estricto *Fusobacterium nucleatum*, especie que domina numéricamente la placa dental (Moore & Moore 1994) y que ha demostrado co-agregación con la práctica totalidad de todas las especies bacterianas evaluadas. Por este motivo, su importancia en la formación de biofilms complejos parece fundamental, ya que permite la llegada de nuevos géneros de mayor patogenicidad (*Treponema*, *Selenomonas*, *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus*, *Helicobacter*, etc.).

#### 1.6.5.2. PATÓGENOS PERIODONTALES



En el Workshop de 1996 se estableció una clasificación de los patógenos en función de su potencial de patogenicidad, quedando divididos de mayor a menor fuerza de evidencia en los siguientes grupos:

- Evidencia fuerte: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*.
- Evidencia moderada: *P. intermedia/nigrescens*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *St. intermedius*, *T. denticola* y espiroquetas.
- Evidencia inicial. *E. corrodens*, bacilos entéricos, *Pseudomonas sp.*, *Selenomonas sp.*, *Staphilococcus sp.* y hongos.

### 1.6.5.3. EL BIOFILM SUBGINGIVAL EN EL EMBARAZO

Una de las hipótesis más sólidas que respaldan el desarrollo de cambios gingivales asociados al embarazo se fundamenta en los posibles cambios microbiológicos que puedan tener lugar en el biofilm subgingival. No obstante, la evidencia a este respecto también es limitada.

Se han propuesto dos posibles alternativas etiopatogénicas: la vía directa y la vía indirecta. La primera opción, el embarazo como factor etiopatogénico directo, propone que el incremento de hormonas sexuales característico del embarazo promueve el sobrecrecimiento de determinadas especies periodontopatógenas, incrementando por consiguiente la inflamación gingival. Estudios en animales han demostrado que cambios en los niveles hormonales esteroideos se asocian con cambios en la microflora vaginal, tracto urinario y tracto gastrointestinal (Bezirtzoglou et al., 2008, Mulholland et al., 1982, Culhane et al., 2001). El estudio *in vitro* de Kornman & Loesche (1982) demuestra que *Bacteroides melaninogenicus susp. intermedius* (actual *Prevotella intermedia sensu lato*), *B. gingivalis* (actual *P. gingivalis*), *B. Melaninogenicus subsp. Melaninogenicus* (actual *Prevotella melaninogenica*, *loeschii* y *denticola*), *A. naeslundii* y *A. viscosus* son capaces de captar esteroides radiomarcados. Por el contrario, *C. ochraceus*, *F. nucleatum* y *S. sanguis* no mostraron radiocaptación. Progesterona y estradiol presentan similitud estructural con la vitamina K, factor de crecimiento esencial para la mayoría de especies de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* (Gibbons & McDonald 1960).

En la hipótesis del mecanismo de acción indirecto, el incremento a la exposición de hormonas sexuales es responsable de provocar cambios en los tejidos gingivales, transformándolos en un ambiente más propicio para el sobrecrecimiento bacteriano. Entre estos factores se incluyen el incremento de las profundidades de sondaje / pseudobolsas (Miyazaki et al. 1991, Tilakaratne et al. 1999, Gürsoy et al. 2009), incremento del exudado crevicular gingival (Lindhe & Branemark 1968 a,b), disminución de la queratinización del margen gingival y reducción de la respuesta inmunológica

(Mariotti et al. 1994). Todos estos factores en su conjunto favorecen la colonización por bacterias de mayor patogenicidad y/o el sobrecrecimiento de las bacterias presentes en el biofilm subgingival. De esta manera, la presencia de patógenos no es la causa sino la consecuencia del empeoramiento del estatus periodontal.

Varios estudios transversales y longitudinales han evaluado el efecto de las hormonas sexuales sobre el biofilm subgingival. Sin embargo, los resultados son controvertidos y por tanto no concluyentes. Diferentes autores han propuesto al incremento de *Prevotella intermedia* durante el embarazo como factor etiológico de la gingivitis gestacional. Kornman & Loesche (1980) fueron los primeros autores en publicar los resultados de un estudio longitudinal en el que *P.intermedia* sufre un incremento durante el segundo trimestre del embarazo, concomitante con el incremento en la inflamación gingival. Tras analizar mediante cultivo las muestras de 20 mujeres gestantes y 11 no embarazadas, comprobaron que el porcentaje de *P.intermedia* ascendió del 2.2% en el primer trimestre al 10.1% en el segundo trimestre (ES), para posteriormente descender al 3.2% en el tercer trimestre y 2.18% postparto. Otras diferencias microbiológicas significativas observadas en este estudio son una disminución en el ratio aerobios/anaerobios y la disminución de *A.viscosus* en el tercer trimestre. Al comparar con el grupo no embarazo, las diferencias fueron significativas en el segundo trimestre para el ratio anaerobio/aerobio así como para las proporciones de *B.intermedius* y *B. Assacharolyticus*. En un estudio transversal, Jensen et al. (1981) obtuvieron un incremento 55 veces mayor en los niveles de bacteroides negropigmentados (*B. Melaninogenicus*, *B. intermedius*, *B.assacharolyticus*) del grupo embarazo y 16% del grupo con anticonceptivos respecto al grupo no embarazo. En el análisis de *fusobacterium* las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, en este estudio no se dan los datos pormenorizados por trimestres ni de las especies bacterianas de forma individual (agrupadas en negropigmentados). Los hallazgos también se confirman en un estudio de gingivitis experimental realizado sobre 9 mujeres (Raber-Durlacher et al. 1994). En esta investigación, tras un exhaustivo control de placa profesional, se detiene el control de placa en la semana 25 del embarazo durante 14 días (inducción de gingivitis experimental). El mismo procedimiento se vuelve a repetir a los 6 meses tras el parto. Tras analizar los resultados microbiológicos constatan un incremento de *P.intermedia* en el segundo trimestre del embarazo concomitante al incremento en la inflamación gingival, mientras que postparto no se observaron cambios microbiológicos. *P. intermedia* también se detectó en lengua y amígdalas, aunque no se apreciaron cambios significativos en estos nichos.

Otros artículos publicados muestran tendencias, pero sin cambios significativos en el biofilm subgingival. Muramatsu et al. (1994) realizaron un estudio transversal sobre 19 mujeres embarazadas, 12 no embarazadas y 8 mujeres postparto de 5 meses. Tras analizar los resultados clínicos y microbiológicos, no encuentran diferencias significativas en los porcentajes de *P. intermedia* durante los diferentes trimestres del embarazo. Sin embargo, al analizar los resultados dividen a las pacientes

en tres subgrupos: (1) Grupo bajo, con un porcentaje de *P.intermedia* de 0-15%; (2) Grupo medio, con porcentajes de *P.intermedia* mayores al 15%, pero no siempre presente y (3) Grupo alto, con porcentajes de *P.intermedia* mayores al 15% y siempre presente. En grupo alto, la inflamación gingival fue mayor, así como las profundidades de sondaje y concentraciones hormonales, aunque las diferencias tampoco fueron significativas.

Adriaens et al (2009) realizaron un estudio longitudinal sobre 20 mujeres embarazadas con hibridación DNA-DNA Checkerboard. El único patógeno que presentó cambios significativos fue la bacteria comensal *Neisseria mucosa*, común en tracto respiratorio y cavidad oral. El resto de patógenos orales no mostraron diferencias significativas a lo largo del embarazo, aunque si se observó la reducción de un elevado número de patógenos (17/37) del primer trimestre en comparación con postparto (*Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium saburreum*, *Fusobacterium nucleatum naviforme*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Leptotrichia buccalis*, *Parvimonas micra* (antes *Peptostreptococcus micros* o *Micromonas micros*), *P. intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Selenomonas noxia*, y *Veillonella parvula*). De forma análoga a Muramatsu et al. (1994), determinados patógenos se asociaron a un incremento en el sangrado gingival en el primer trimestre (*P.gingivalis* y *T.forsythia*) y segundo trimestre (*A. naeslundii*, *A.odontoliticus*, *P.nigrescens*).

*P.intermedia* y *P.nigrescens* son dos especies bacterianas fenotípicamente idénticas, por lo que no es posible su diferenciación mediante el cultivo y los resultados se presentan como la suma de ambas especies (*P.intermedia sensu lato*). Gürsoy et al. (2009) emplean técnicas moleculares (PCR) para diferenciar ambas especies y contrastar los resultados previamente publicados sobre la asociación de *P.intermedia sensu lato* al embarazo. Realizan un estudio longitudinal similar al protocolo de Kornman & Loesche (1980) sobre 30 mujeres embarazadas y 24 no embarazadas. Al analizar las muestras mediante cultivo, *P.intermedia sensu lato* incrementó del primer al segundo trimestre, disminuyendo en el tercer trimestre y de nuevo incrementando postparto. Las diferencias solo fueron significativas para el incremento de *P.intermedia sensu lato* experimentado del tercer trimestre a postparto, para posteriormente tras finalizar la lactancia, volver a descender. *P.intermedia* y *P.nigrescens* también se detectaron en saliva, sin mostrar diferencias significativas. Los autores también realizaron un subanálisis para valorar la presencia de patógenos con la inflamación gingival, análogo al realizado por Muramatsu et al. (1994) y Adriaens et al. (2009). Las localizaciones con *P.intermedia* presentaron tendencia a exhibir mayor inflamación y sangrado al sondaje, sin diferencias en los niveles de placa, respecto a las localizaciones *P.intermedia* negativas. Éste es el primer artículo publicado de gingivitis gestacional que separa *P.intermedia* de *P.nigrescens*. En el análisis con PCR

observaron que el 95,3% fue *P.nigrescens* frente al 2.5% de *P.intermedia* y 2.2% sin identificar, lo que demuestra que la bacteria principalmente implicada en el embarazo es *P.nigrescens*.

Existen también otros artículos publicados en los que los resultados obtenidos son negativos, lo cual implica que no encuentran diferencias en el biofil subgingival. Jonsson et al. (1988) realizan un estudio transversal en el que toman muestras microbiológicas, clínicas y hormonales en 7 mujeres embarazadas (2 y 3 trimestre), 14 mujeres no embarazadas y 9 hombres. En este estudio, el incremento de los niveles hormonales no se asoció con diferencias en los niveles de *B.intermedius* en el grupo embarazo, siendo del 1.6% en el segundo trimestre y 1.8% en el tercer trimestre. No hubo diferencias singificativas en ninguna de las variables microbiológicas evaluadas entre los grupos embarazo y no embarazo. Los hombres presentaron significativamente mayor porcentaje de Gram negativos, *Bacteroides* y *Bacteroides intermedius*.

La discrepancia entre los estudios es el reflejo de diferencias en la estandarización del diseño del estudio, población estudiada y técnicas empleadas. La tabla 10 pone de manifiesto las diferentes metodologías empleadas.

AUTOR, AÑO	PACIENTES	MÉTODO	TÉCNICA
<b>Kornman &amp;Loesche, 1980</b>	- 20 embarazadas (< 13 semanas) - 11 no embarazadas.  No periodontitis.	Embarazo: examen mensual + postparto. No embarazo: 4 meses consecutivos.  Muestra en dos localizaciones: 15M y 33M.	Cultivo. Cureta estéril. RTF  <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolitycus</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>B. melaninogenicus ss. intermedius</i> , <i>B. melaninogenicus ss.melaninogenicus</i> . <i>B. assacharolyticus</i> . <i>C. ochareus</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>S. sanguis</i> .
<b>Jonsson et al. 1988</b>	- 9 hombres. - 7 embarazadas. - 14 no embarazadas.  No tto dental 6 meses	“Pool” de las 5 localizaciones con mayor PS y BoP.	Cultivo + test bioquímicos. Puntas de papel.  <i>Bacteroides assacharolyticus</i> , <i>B. buccae</i> , <i>B. buccali</i> , <i>B.denticola</i> , <i>B. corporis</i> , <i>B. gingivalis</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B. levii</i> , <i>B. macacae</i> , <i>B. melaninogenicus</i> , <i>B. oralis</i> , <i>B. Oris</i>
<b>Jensen et al. 1981</b>	104 mujeres: - 54 embarazadas. - 27 no embarazadas. - 23 anticonceptivos  Sin tratamiento periodontal previo.	Muestra 16 y 26. Mesiovestibular.	Cultivo. Curreta estéril.  Fusobacterium. Negropigmentados ( <i>B. melaninogenicus</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B.assacharolyticus</i> ).
<b>Raber-Durlacher et al. 1994</b>	- 9 embarazadas. - 8 postparto.  No periodontitis	Gingivitis experimental durante 14 días (semana 25 y 6 meses postparto). Muestra: Papila C-PM días: 0,4,	Cultivo FCG, lengua y amígdalas. Tiranervios ertéril.  Grupo <i>P.melaninogenica</i> ( <i>P.melaninogenica</i> , <i>P.denticola</i> , <i>P.loeschii</i> )

		8 y 14.	y <i>P.intermedia</i> .
<b>Muramatsu &amp; Takaesu 1994</b>	- 19 embarazadas - 12 no embarazadas - 8 postparto de 5 meses	Anteriores con mayor inflamación. Agrupación % Pi: - Low group: 0-15% - Middle ( $\pm$ ) >15% - High (+): >15%	Cultivo. Puntas papel.  <i>Actinomyces, Streptococcus, negropigmentados, P.intermedia.</i>
<b>Adriaens et al. 2009</b>	- 20 embarazadas  No periodontitis/ periodontitis leve	Muestra micro: semanas 12, 28, 36 y 4-6 postparto.  MV 16, 26, 36, 46. 2 puntas consecutivas	Hibridación DNA-DNA checkerboard. Semicuantificación. 37 especies.
<b>Gürsoy et al. 2009</b>	- 30 embarazadas - 24 no embarazo	Embarazo: 1T, 2T, 3T, 4-6s PP, tras lactancia. Control: 3 meses consecutivos. Muestra: MV de 1M o 2 M en ausencia	Cultivo. Selección colonias negropigmentadas.  PCR 16s.  <i>P.intermedia/P.nigrescens.</i>

Tabla 10. Características metodológicas de los diferentes estudios que evalúan los cambios microbiológicos en mujeres embarazadas.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

El embarazo favorece provoca cambios inmunológicos y microbiológicos, los cuales manifiestan clínicamente en un emporamiento transitorio del estado gingival preexistente.

## JUSTIFICACIÓN

Se han propuesto diferentes hipótesis etiológicas, entre las que destacan posibles cambios microbiológicos e inmunológicos, para tratar de explicar los cambios gingivales observados durante el embarazo. Sin embargo, los resultados no son concluyentes. Además, gran parte de las publicaciones existentes son estudios clásicos, con sesgos metodológicos, de diseño y con muestras no homogéneas, lo cual dificulta el análisis e interpretación de los resultados.

Dado que la respuesta del periodonto probablemente sea de naturaleza multifactorial, la evaluación simultánea de diferentes factores etiológicos permitiría un análisis etiopatogénico de esta endocrinopatía más adecuado.

## OBJETIVOS

**OBJETIVO PRINCIPAL.** Evaluar de forma simultánea la influencia que ejercen diferentes factores etiológicos potenciales sobre el incremento en la inflamación gingival observada en un grupo de mujeres gestantes en comparación con un grupo de mujeres no embarazadas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.** Los objetivos específicos, analizados de forma pormenorizada en los tres artículos objeto de la presente tesis doctoral, son:

*Estudio I. Gingival changes during pregnancy: I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters.*

- Evaluar los cambios clínicos acontecidos durante el embarazo en un grupo de mujeres embarazadas en comparación con un grupo de mujeres no embarazadas.
- Evaluar la influencia de las características sociodemográficas de la muestra, así como de la atención dental recibida.
- Analizar si el incremento de la inflamación gingival observado durante el embarazo se asocia a cambios inmunológicos (IL-1 $\beta$  y PGE2 en fluido crevicular gingival (FCG)).

*Estudio II. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm.*

- Evaluar la hipótesis que sostiene que el embarazo induce cambios en el biofilm subgingival que repercuten en el incremento de la inflamación gingival desarrollada en las mujeres gestantes.
- Evaluar longitudinal y prospectivamente las posibles variaciones microbiológicas en el biofilm subgingival durante los tres trimestres del embarazo.
- Evaluar si la presencia de patógenos periodontales está asociado a un incremento de la inflamación gingival.

- Correlacionar los parámetros microbiológicos con los parámetros clínicos y hormonales asociados.
- Comparar los hallazgos microbiológicos del embarazo con los resultados postparto y con un grupo de mujeres no embarazadas.

*Estudio III. Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation.*

- Complementar el análisis inmunológico mediante el análisis mediadores destacables de la inflamación periodontal, específicamente si el incremento de la inflamación gingival durante el embarazo se asocia a cambios en el FCG de IL-6 y TNF  $-\alpha$ .
- Evaluar mediante un análisis predictor multivariante el efecto ejercido de todos los factores analizados en el presente estudio (clínicos, socio-demográficos, inmunológicos y microbiológicos) sobre la inflamación gingival de la mujer embarazada.



# PACIENTES, MATERIAL & MÉTODO

## 5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo, abierto y de diseño paralelo. El período de seguimiento fue de 9 meses en las pacientes gestantes (grupo embarazo) y de 6 meses en las pacientes no embarazadas (grupo no-embarazo).

Todas las participantes aceptaron voluntariamente la inclusión en el estudio y firmaron el consentimiento informado, aprobado por el comité de Ética e Investigación del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

## 5.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los sujetos potenciales fueron reclutados de forma consecutiva en el Departamento de Obstetricia del Hospital José Marvá (grupo embarazo) y en el Departamento de Recepción de Pacientes de la Facultad Complutense de Odontología (grupo no-embarazo).

Todos los sujetos potenciales recibieron un examen periodontal inicial, incluyendo profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínico (NIC) y sangrado al sondaje en todos los dientes presentes, a excepción de terceros molares, en 6 localizaciones por diente. Tras establecer el diagnóstico periodontal (Armitage, 1999), todos los sujetos que cumplieron los criterios de inclusión/exclusión fueron invitados a participar en el estudio hasta alcanzar los tamaños muestrales pre-establecidos.

### **Criterios de inclusión/exclusión**

#### *Criterios de inclusión:*

- (i) Presentar una edad comprendida entre los 20-35 años.
- (ii) Presencia mayor o igual a 20 dientes naturales, excluyendo terceros molares.

#### *Criterios de exclusión:*

- (i) Diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva (Armitage 1999).
- (ii) Presencia de patología aguda dental o periodontal.
- (iii) Hábito tabáquico.
- (iv) Presencia de patología sistémica y/o medicación con repercusión periodontal.
- (v) Haber recibido tratamiento antibiótico o profilaxis dental en los 6 meses previos.

Además de los criterios de inclusión/exclusión previamente descritos, las mujeres embarazadas fueron incluidas si se encontraban entre la semana 12 y 14 del embarazo, y las mujeres no embarazadas

fueron excluidas si estaban bajo tratamiento anticonceptivo o bien si estaban embarazadas o bien planificando poder estarlo.

### **5.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL**

En el diseño del estudio se contempló el cálculo del tamaño muestral para evitar que la ausencia de significación estadística pudiera ser consecuencia de una muestra insuficiente en cuanto al número de sujetos. El cálculo del tamaño muestral se estableció tras determinar una magnitud en la diferencia a detectar que fuera clínicamente relevante. Para ello, basado en los resultados de estudios previos sobre gingivitis gestacional (Cohen 1969, Tilakaratne et al. 2000), se estableció una diferencia de 0.15 en el valor del índice gingival (Sillness & Løe 1963) como referencia para determinar el tamaño muestral. Se empleó la aplicación estadística Sample Power 2.0 para el programa SPSS. Como resultado de este análisis, se obtuvo una muestra final de 45 pacientes para tener una potencia del 80% (error  $\beta$ ) para detectar diferencias de 0.15 en el índice gingival durante el embarazo, con un error alpha de 0.05.

El tamaño muestral se estableció en 60 mujeres embarazadas con el objetivo de compensar la posible pérdida de pacientes a lo largo del estudio, tanto por retiradas por parte del investigador como por abandonos por parte de las pacientes. En el caso del grupo control, el tamaño muestral estipulado fue de 30 pacientes.

### **5.4. PLAN DE TRATAJO**

El protocolo de actuación fue el siguiente:

#### **Grupo embarazo**

Las mujeres gestantes recibieron 3 visitas durante el embarazo, incluyendo: final del primer trimestre (semanas 12-14 del embarazo); segundo trimestre (semanas 23-25 del embarazo) y tercer trimestre (semanas 33-36 del embarazo). Tres meses después del parto se realizó la cuarta y última visita para este grupo de estudio.

#### **Grupo no-embarazo**

Las mujeres no embarazadas fueron evaluadas un total de dos veces, con un intervalo de seis meses de separación entre ambas visitas. Las visitas de este grupo coincidieron cronológicamente con las visitas 1 y 3 del grupo embarazo. El control del estado hormonal de este grupo se realizó programando la visita durante la fase lútea del ciclo menstrual (días 17-21) (Zaki, 1984).

En el presente estudio se incluyeron variables clínicas, socio-demográficas, inmunológicas y microbiológicas, las cuales se detallan a continuación. Los registros se obtuvieron de manera secuencial, de forma que ninguna muestra resultase comprometida. Para ello, en primer lugar se obtuvo la muestra de saliva para análisis hormonal, a continuación se determinó el índice de placa, seguido de la toma de muestras inmunológicas y microbiológicas, para finalmente proceder al registro del índice gingival (Fig. 2)

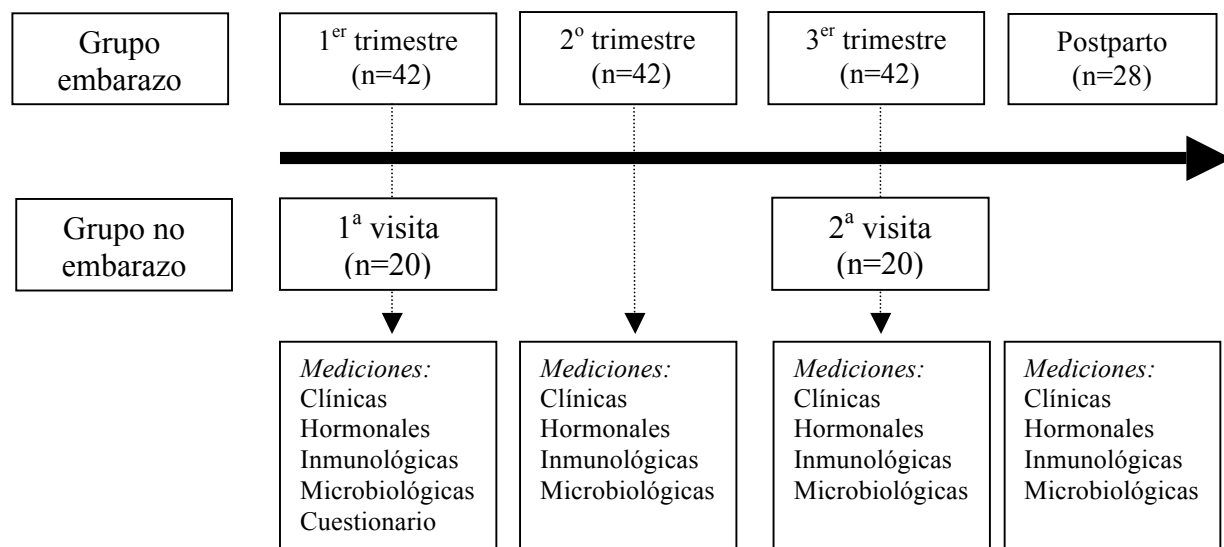


Fig.2. Esquema del plan de trabajo y seguimiento del grupo embarazo y no embarazo.

Una vez concluidas las evaluaciones y toma de muestras en la primera visita, las pacientes recibieron instrucciones de higiene oral y se les obsequió con un cepillo dental (Vitis access ®, Dentaïd, Barcelona) y un dentífrico (Colgate Total ®, Palmolive®, Piscataway, NJ, EEUU). Al final del estudio todas las pacientes recibieron una profilaxis dental.

## 5.5.VARIABLES CLÍNICAS

Se registraron los siguientes parámetros clínicos:

- Índice Gingival (GI) (Löe & Silness 1963).
- Índice de Placa (PII) (Silness & Löe 1964).

Las mediciones se realizaron sobre 4 localizaciones/diente, en todos los dientes presentes a excepción de terceros molares con la sonda periodontal CPC-12 (Hu-Friedy®, Leimen, Alemania), por un mismo examinador (EF).

En cada visita, también se valoró la posible presencia de alteraciones en la mucosa, tales como el granuloma piógeno.

## **5.6. VARIABLES SOCIO-DEMOGRÁFICAS**

Mediante un cuestionario estructurado (Yalcin et al. 2002) se recogieron las características socio-demográficas de la muestra, así como la atención dental previa recibida. A diferencia del resto de variables, las características socio-demográficas solo se obtuvieron en la primera visita.

Las variables recogidas se obtuvieron tras la recopilación de los siguientes datos presentes en el cuestionario:

### **Datos socio-demográficos**

- Edad
- Nivel educacional (ninguno, educación primaria, educación secundaria, estudios universitarios).
- Profesión (empleado, profesión liberal, ama de casa, estudiante).
- Embarazos previos (Sí/No). En las pacientes que sí habían tenido embarazos previos se registró el número y si habían sufrido alteraciones bucales previas.

### **Atención dental previa recibida**

- Fecha de última visita al dentista (menos de 1 año, 1 año, más de 1 año).
- Frecuencia de cepillado dental diario ( 3 veces/día, 2 veces/día, 1 vez/día, menos de 1 vez/día)
- Auto-percepción del estado de salud bucal (malo, normal, bueno).

## **5.7. ANÁLISIS HORMONAL**

La muestra de saliva, primera en tomar para evitar contaminación, se recogió en viales testados para muestras salivales (DIA.METRA® Saliva Collection Device). Se le indicó a la paciente que dejase fluir saliva en un vial durante 2 minutos para recoger saliva no estimulada (Tallon et al. 1984, Gann et al. 2001). Previamente las pacientes se enjuagaron con agua y reposaron durante 5 minutos. Las muestras se almacenaron a -20° C para su posterior procesamiento (Tallon et al. 1984, Zaki et al. 1984, Morishita et al. 1988, Meulenberg & Hofman 1989, Gann et al. 2001) mediante el análisis de las concentraciones, expresadas en pg/ml, de estradiol y progesterona presente en las muestras salivales.

El método para su cuantificación fue el análisis inmunoenzimático colorimétrico competitivo (ELISA) (DIA.METRA S.r.l, Foligno, Italia). Según esta tecnología, la progesterona/estradiol presentes en el

campo compiten con un antígeno marcado con peroxidasa (horseradish peroxidase, HRP conjugate) para unirse contra un número limitado de anticuerpos anti-progesterona. Tras la incubación, la porción unida/libre se separa mediante lavado. A continuación se añaden los reactivos (peróxido de hidrógeno y sustrato TMB) para que tenga lugar el desarrollo de la coloración y la medición de la absorbancia mediante espectrofotómetro. La concentración de estradiol y progesterona se calcula a partir de una curva patrón de absorbancias conocidas, siendo la intensidad del color inversamente proporcional a la concentración de progesterona en la muestra.

El procedimiento empleado se detalla a continuación:

#### **Agentes empleados:**

- Standards de progesterona y estradiol 5x. En el caso de la progesterona, corresponden a concentraciones de progesterona conocidas para la confección de la curva patrón (0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml y 500 pg/ml y 3000 pg/ml). Se representan en una gráfica bajo la codificación de S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub> respectivamente. En el caso del estradiol, corresponden a concentraciones de estradiol conocidas de 0 pg/ml, 1 pg/ml, 5 pg/ml, 20 pg/ml y 100 pg/ml). Se representan en una gráfica bajo la codificación de S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub> respectivamente.
- Solución tampón fosfato (Incubation phosphate buffer), 30 ml.
- Conjugado (Conjugado HRP progesterona), 0,4 ml.
- Anti-progesterona IgG / Anti-estradiol-IgG. Se presentan adsorbidas en sus correspondientes placas de micropocillos.
- Sustrato TMB (Cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tetrametilbencidina (TMB)). 12 ml.
- Solución Stop (ácido sulfúrico 0.15 mol/l). 12 ml.
- Solución de lavado (wash solution). 50X (NaCl 9gr/l + 1gr/l de detergente polisorbato 20 (tween 20) 1gr/l).

#### **Procedimiento:**

1. Preparación de la curva patrón (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>). Se realiza a partir de las concentraciones de progesterona/estradiol conocidas presentes los respectivos Kits.
2. Preparación de la solución lavado. Dilución de la solución lavado en 1000 ml de agua destilada y mantener a temperatura ambiente.
3. Preparación del conjugado. Mezcla de 10 µl de conjugado con 1.0 ml de solución tampón fosfato (Buffer). A continuación se deja reposar durante 3 horas a una temperatura de 22-28°C.
4. Preparación de la muestra de saliva. La saliva se centrifugó a 4.000 r.p.m durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a 2-8°C para ser analizada en un plazo inferior a una semana.

5. Preparación de la reacción inmunoenzimática. Se inició mediante la preparación de los seis puntos de la curva patrón para progesterona ( $S_0$ - $S_5$ ) y cinco para el patrón de estradiol ( $S_0$ - $S_4$ ), ambos por duplicado. A continuación se realizó el análisis de las muestras, tal y como se detalla a continuación (tablas 20 y 21).
  - a. *Progesterona*. En los pocillos se añadió 50  $\mu$ l de las diferentes concentraciones de progesterona standard y 200  $\mu$ l de conjugado. Se incubó a temperatura ambiente (22-28°C) durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se procedió al lavado para la separación de la porción libre/unida y se añadió 100  $\mu$ l de sustrato cromógeno. Para finalizar la reacción se agregaron los 100  $\mu$ l de solución stop a cada pocillo y se realizó la lectura de los resultados mediante espectrofotómetro a 450 nm frente al blanco. Se realizó el análisis estadístico de la tendencia gráfica de la curva patrón. Si el ajuste de las curvas era adecuado, se procedió al análisis de las muestras de forma idéntica a la curva patrón, añadiendo 50  $\mu$ l de muestra por pocillo.
  - b. *Estradiol*. En los pocillos se añadió 100  $\mu$ l de las diferentes concentraciones de progesterona standard y 100  $\mu$ l de conjugado. Se incubó a temperatura ambiente (22-28°C) durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se procedió al lavado para la separación de la porción libre/unida y se añadió 100  $\mu$ l de sustrato cromógeno. Para finalizar la reacción se agregaron los 100  $\mu$ l de solución stop a cada pocillo y se realizó la lectura de los resultados mediante espectrofotómetro a 450 nm frente al blanco. Se realizó el análisis estadístico de la tendencia gráfica de la curva patrón. Si el ajuste de las curvas era adecuado, se procedió al análisis de las muestras de forma idéntica a la curva patrón, añadiendo 50  $\mu$ l de muestra por pocillo.

PROGESTERONA	Standard	Muestra	Blanco
Muestra		50 $\mu$ l	
Standards ( $S_0$ - $S_5$ )	50 $\mu$ l		
Dilución Conjugado	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	
Solución lavado	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	
Sustrato cromógeno	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Solución stop	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Tabla 11. Reactivos para el análisis inmunoenzimático de progesterona en saliva

ESTRADIOL	Standard	Muestra	Blanco
Muestra		100 $\mu$ l	
Standards ( $S_0$ - $S_5$ )	100 $\mu$ l		

Dilución Conjugado	100 µl	100 µl	
Solución lavado	300 µl	300 µl	
Sustrato cromógeno	100 µl	100 µl	100 µl
Solución stop	100 µl	100 µl	100 µl

*Tabla 12.* Reactivos para el análisis inmunoenzimático de estradiol en saliva.

## 6. Resultados.

- Se calculó la absorbancia media (Em) de de cada punto de la curva patrón y de cada muestra.
- Se trazó la curva patrón de mejor ajuste a partir de los valores medios de las absorbancias estándar frente a las concentraciones conocidas para conocer las concentraciones de las muestras (pg/ml), se aplicó la curva patrón mediante la interpolación de resultados.

## 5.8.VARIABLES INMUNOLÓGICAS (IL1-β, IL-6, TNF-α Y PGE2)

### 5.8.1. TOMA DE MUESTRAS DE FCG

El FCG se recogió del surco gingival mesio-vestibular de ambos caninos superiores (1.3 y 2.3) mediante tiras de papel absorbente Harco Periopaper ( Harco, Irvine, CA, EEUU). Se tomaron 2 muestras por visita (una por cada canino) y paciente. La selección de estas localizaciones se basó en estudios previos que demuestran que los dientes anterosuperiores son los que presentan proporcionalmente mayor inflamación (Löe & Silness 1963).

Para la toma de muestra, se aisló individualmente cada localización con rollos de algodón y se retiró la placa supragingival con precaución de no incidir en el margen gingival. El área se secó suavemente con ayuda de la jeringa de aire del equipo dental, incidiendo de forma paralela en dirección apico-coronal a la superficie radicular. A continuación, cada tira de Periopaper se insertó en el surco gingival hasta notar resistencia y se mantuvo en la localización durante 30 segundos (Silva et al. 2008, Yucel et al. 2008). Las muestras contaminadas con sangre fueron descartadas (Engebretson et al. 2002) y se tomó una muestra del surco mesio-vestibular del primer premolar adyacente (1.4 o 2.4). Si esta segunda muestra también resultó contaminada, la muestra se desechó y el dato fue registrado como ausente.

### 5.8.2. CALIBRACIÓN DEL PERIOTRON

Cada tira de Periopaper fue evaluada mediante Periotron 8000 para medir el volumen presente (en unidades de periotron) (Harco)(Chappel et al. 1999) y se almacenó en un tubo Eppendorf estéril a - 80°C hasta reunir las muestras suficientes para proceder al análisis de las mismas.



### 5.8.3. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO. IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ Y PGE2.

#### *Extracción de IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ y PGE2 del FCG*

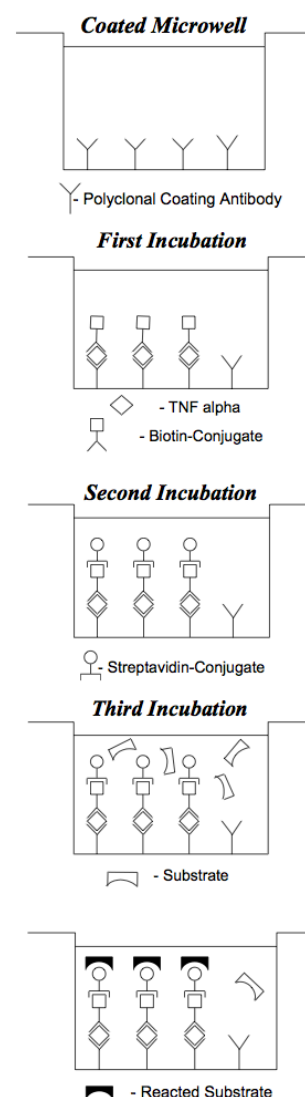
Se retiraron las muestras del ultracongelador (-80°C) y se mantuvieron a temperatura ambiente 1 hora hasta completar el descongelado de las mismas. Para proceder a la extracción del FCG de las tiras de Periopaper, se introdujeron en alícuotas de solución tampón (solución tampón-fosfato 50 mM, pH 7.2, con inhibidores de proteasas, 0.1 mM fenilmetilsulfonil fluouro) (Uematsu et al. 1996). Cada tira de Periopaper se introdujo en 200  $\mu$ l de solución tampón en tubos Eppendorf estériles y se dejaron reposar durante 2 minutos a 4°C.

A continuación, los tubos Eppendorf se centrifugaron a 19.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue recogido y se empleó para la determinación de los mediadores. La muestra del FCG del diente 1.3 se empleó para evaluar TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mientras que la procedente del diente 2.3 permitió la evaluación de IL-6 y PGE2.

#### *Tests de ELISA*

El análisis inmunológico se realizó mediante el test de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / enzimoimmunoanálisis de adsorción). Mediante esta técnica diagnóstica, la detección de los mediadores de la inflamación objeto de estudio (IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2) se identifican mediante anticuerpos marcados. La reacción presenta las siguientes fases:

1. Adsorción de los anticuerpos monoclonales a los pocillos (anticuerpos anti- IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2).
2. *Primera incubación.* Se añaden las muestras a los pocillos. IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2 presentes en la muestra se unen a los anticuerpos correspondientes. A continuación se añaden anticuerpos anti-IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2 con conjugado de biotina, con objeto de unirse a la reacción anterior.
3. Mediante lavado se procede a la separación de la porción libre/unida.
4. *Segunda incubación.* Se añade estreptavina-HRP para unirse al complejo biotín-conjugado. Se procede a continuación al



lavado para la separación de la fracción libre/unida. Se añade a continuación la solución sustrato, que reacciona con HRP.

5. Medición de la absorbancia con espectrofotómetro a 450nm.
6. Evaluación de resultados mediante curva patrón.

## **5.9. VARIABLES MICROBIOLÓGICAS**

### **5.9.1. SELECCIÓN DE LOCALIZACIONES**

En cada visita se tomó una muestra agrupada de las cuatro localizaciones (una por cuadrante) que presentasen mayor grado inflamación. Se evaluaron detenidamente las localizaciones anteriores, dado que se ha descrito que son las que sufren mayores cambios (Löe & Silness 1963, Hugoson et al. 1971, Muramatsu et al. 1994) y se excluyeron aquellas localizaciones en las que se insertó una tira de papel absorbente de periopaper para análisis inmunológico (Harco, Irvine, CA, USA). Para la toma de muestra, en primer lugar se retiraron los depósitos de placa supragingival para a continuación aislar la zona mediante rollos de algodón por vestibular en maxilar, y por vestibular y lingual para la arcada inferior. A continuación, tras secar suavemente la saliva supragingival con la jeringa de aire en dirección coronal para evitar la desecación del surco gingival, se insertaron subgingivalmente de forma consecutiva dos puntas de papel estéril # 30 (Zipperer®, United Dental MFRS Inc., West Palm Beach, FL, U.S.A.) durante 10 segundos cada una. Todas las puntas se transfirieron a un vial con 1.5 ml de medio de transporte reducido (Reduced Transport Fluid, RTF) (Syed & Loesche 1972). El medio RTF es un medio de transporte reducido que permite que las muestras se mantengan y puedan ser inoculadas en las subsiguientes 24 horas después de la toma, debido a que una vez transcurrido ese tiempo desde la toma de muestra, las proporciones de los microorganismos anaerobios en la muestra se pueden disminuir por el sobrecrecimiento de bacilos entéricos gram negativos en el medio de transporte. Las muestras deben conservarse a 4 °C hasta su procesamiento en las próximas 24 horas.

Todas las muestras microbiológicas fueron tomadas por el mismo examinador (AC).

### **5.9.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE MUESTRAS**

El cultivo microbiológico de las muestras se realizó en el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Descripción del procedimiento de cultivo de muestras:

1. *Dispersión*. Las muestras fueron dispersadas mediante vortex durante 30 segundos, con el objetivo de romper los agregados bacterianos y proceder a la homogenización de la muestra.
2. *Diluciones*. Se realizaron diluciones décimo normales ( $10^{-0}$  -  $10^{-6}$ ) de la muestra en medio PBS (*Phosphate-Buffered saline*, Solución tampón-fosfato) antes de proceder al procesamiento de las muestras. Para ello se toman 0,1 ml del vial y se diluye en 0,9 ml de PBS ( $10^{-1}$ ), de este tubo se toman de nuevo 0,1 ml y se añade a otro de nuevo que contenga 0,9 ml de PBS ( $10^{-2}$ ), y así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-6}$ .
3. *Inoculación*. Se dispersa 0,1 ml de las diluciones 0 y 1 en un medio de cultivo selectivo de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y 0,1 ml de las diluciones 1, 2 y 3 en un medio de agar-sangre. La muestra se distribuye homogéneamente en la placa de Petri con ayuda de un asa de vidrio.

Los medios de cultivo empleados fueron:

- Medio no selectivo agar-sangre al 5% de sangre de caballo (Oxoid no.2, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), suplementado con hemina (5mg/l) y menadiona (1 mg/l). Este medio se emplea para la obtención del crecimiento de todas las bacterias presentes en la muestra, para así realizar la determinación del recuento bacteriano total y el recuento de patógenos específicos (*P. intermedia/nigrescens*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* y *Capnocytophaga* sp).
  - Medio selectivo Dentaaid-1 (Alsina et al. 2001), para el aislamiento y recuento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En este medio pueden aparecer otros crecimientos, generalmente hongos o colonias de *Haemophilus*, que son mas redondeadas y mas convexas. Para confirmar la presencia de *Aa* se realizará la prueba de la catalasa con adición de  $H_2O_2$  al 3% que sólo en caso positivo producirá la aparición de burbujas.
4. *Incubación*
    - Medio Agar-sangre: se incuba durante 7 días en estufa a 37°C y en jarras de anaerobiosis con 80% de  $N_2$ , 10% de  $H_2$  y 10% de  $CO_2$ . Para algunas especies de crecimiento más lento es necesario incubar otros 7 días
    - Medio Dentaaid para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Se incuba 2-3 días en estufa a 37°C en una atmósfera con un 5% de  $CO_2$ .
  5. *Identificación*. Se procederá al recuento e identificación de los distintos tipos bacterianos morfológicos existentes a los 7-14 días de la incubación por medio de un esteromicroscopio (SDZ-PL, Kyowa Optical Co. Ltd., Hashimoto, Japón). Se determinarán así los recuentos bacterianos totales mediante el total de unidades formadoras de colonias (total UFC/ml), así como recuentos absolutos y porcentajes de los distintos patógenos respecto a la flora total

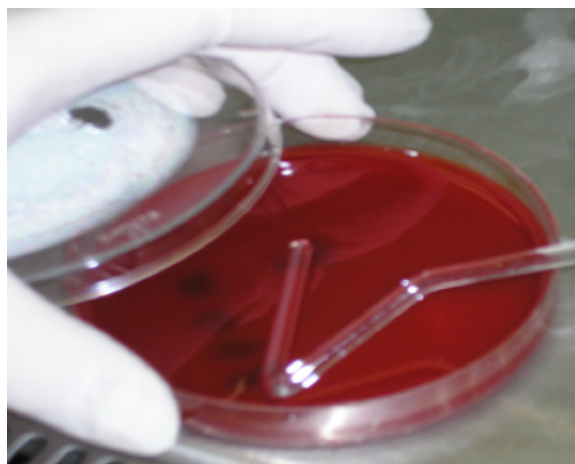
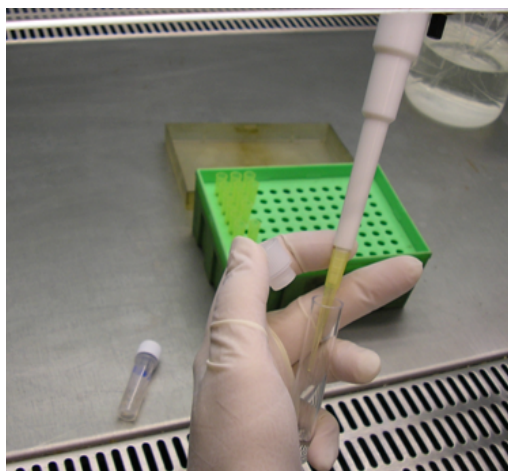
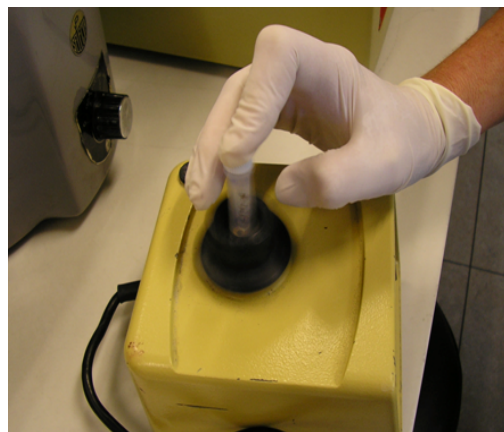
(Figs. 3-9). La confirmación de patógenos se realizó mediante tinción de Gram y morfología celular, aerotolerancia y pruebas bioquímicas (Rapid ID 32A, BioMerieux SA, Le-Balme-les-Grottes, Francia).

#### **Formulación de los medios de cultivo empleados:**

- Medio Dentaïd. Brain heart infusion agar, extracto de levadura, vancomicina, fumarato sódico, formiato sódico, agua destilada.
- Medio agar-sangre. Blood- agar base, solución de hemina-menadiona, sangre de caballo desfibrinada, agua destilada.

#### **Formulación de los medios de transporte y de dilución:**

- R.T.F.  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaCl,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgSO_4$ , EDTA,  $Na_2CO_3$ , ditioneitol, agua destilada.
- Medio de dilución P.B.S. NaCl,
- KCl,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , agua destilada.





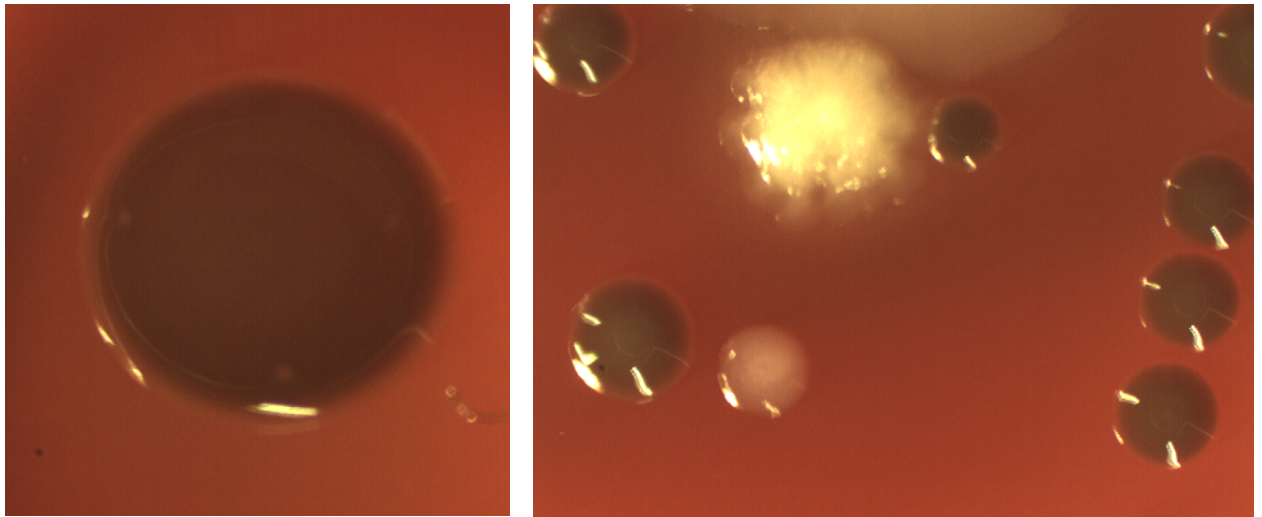


Figura 3. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *A. actinomycetemcomitans*. Laboratorio de microbiología. UCM.

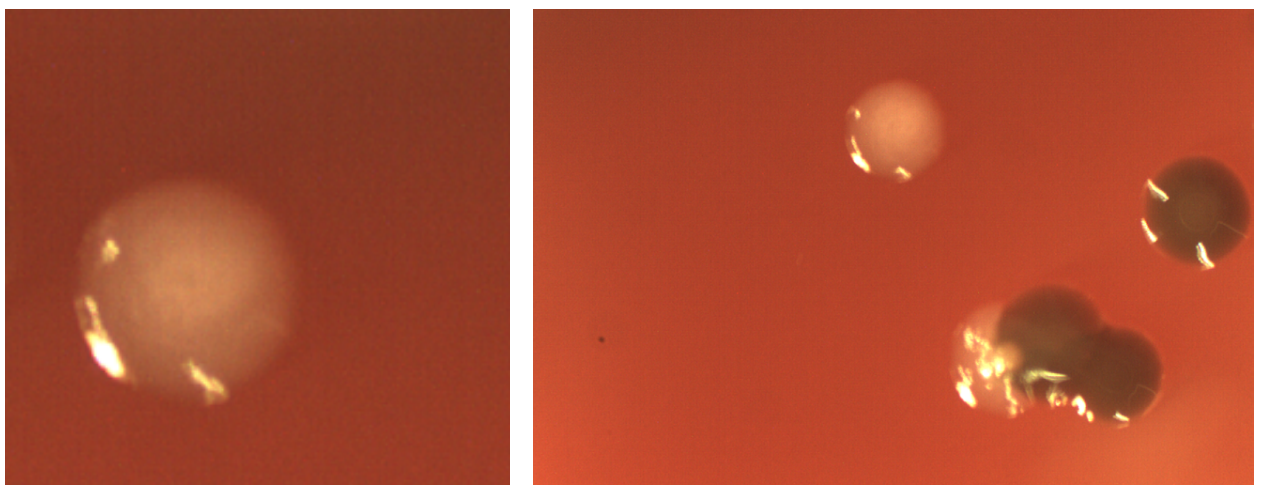


Figura 4. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *P. gingivalis*. Laboratorio de microbiología. UCM.

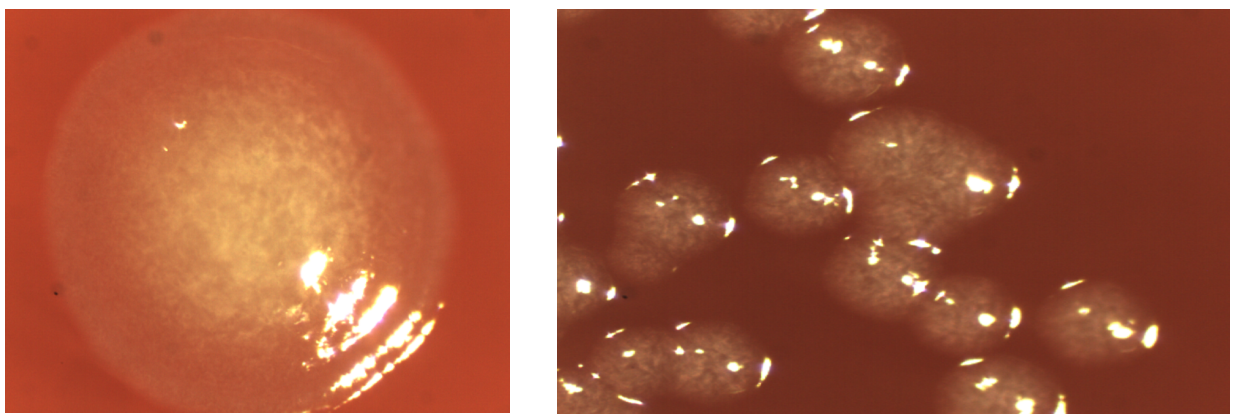
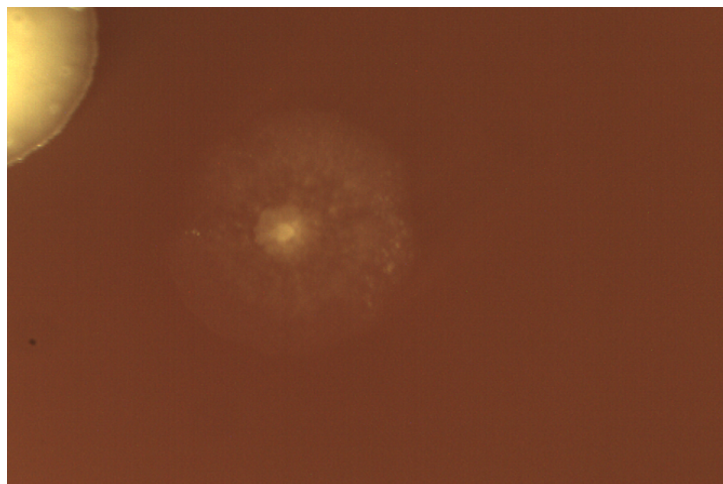
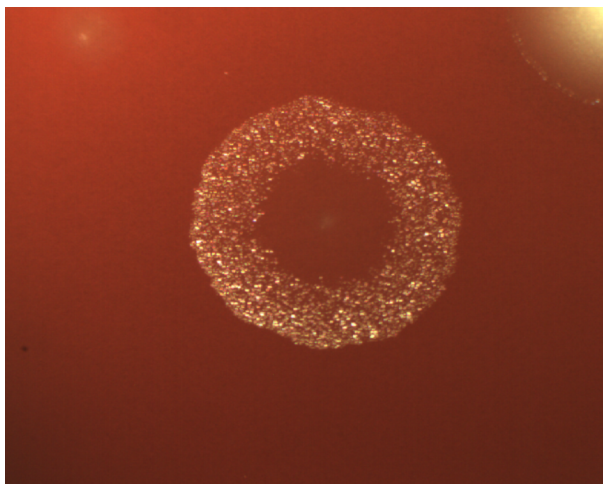
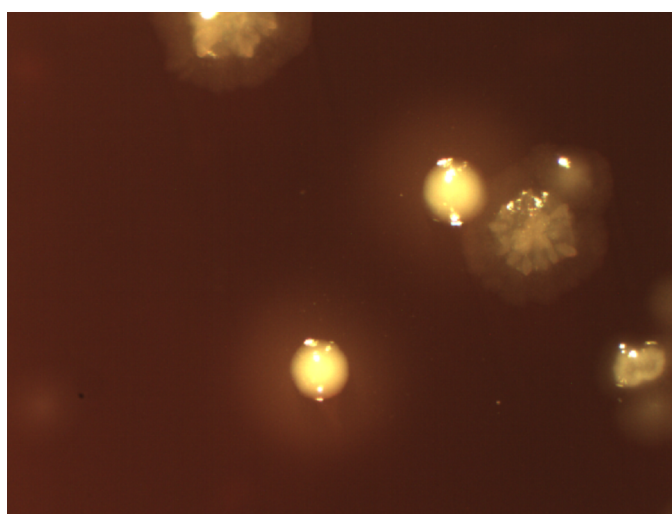
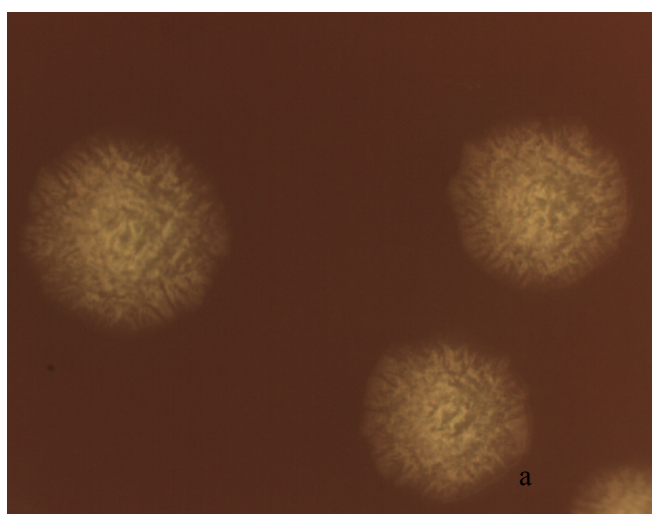


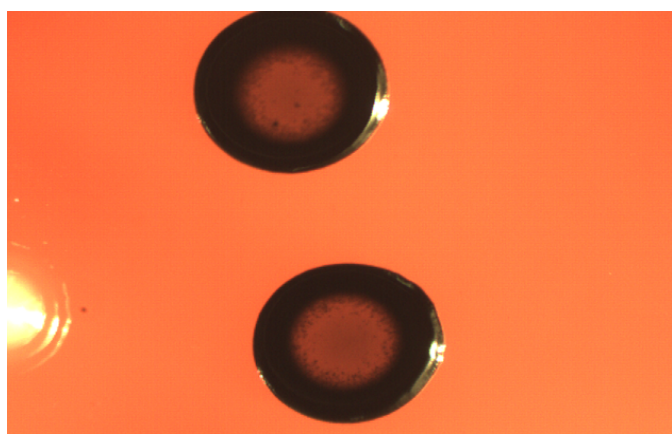
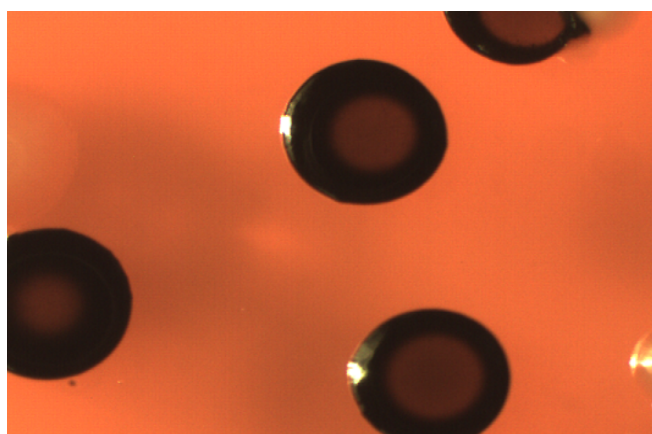
Figura 5. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *T. forsythia*. Laboratorio de microbiología. UCM.



Figuras 6 y 7. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *C.rectus* (a) y *Eikenella corrodens* (b). Laboratorio de microbiología. UCM.



Figuras 7 y 8. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *F.nucleatum* (a) y *P.micra* (b). Laboratorio de microbiología. UCM.



Figuras 8 y 9. Identificación morfológica mediante esteromicroscopio de *P.intermedia*. Laboratorio de microbiología. UCM.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística se estableció al 95% de intervalo de confianza (error  $\alpha=0,05$ ) y la unidad de análisis seleccionada fue el sujeto. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS para Windows (SPSS Inc. versiones 16 y 18).

Para evaluar la bondad de ajuste a la normalidad de las diferentes variables objeto de estudio, se aplicó el test Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó estadística paramétrica para las variables que se ajustaron a la normalidad, mientras que los test no paramétricos se emplearon para las variables no normales. Los datos se expresan en media y desviación estándar (SD), así como en mediana y rango intercuartil (RI) para las variables no paramétricas.

### ESTUDIO I

Se calculó la media y desviación estándar (SD) de las localizaciones con valor 1, 2 y 3 de los índices de placa (PII) y gingival (GI) para boca completa (full-mouth), localizaciones anteriores y localizaciones posteriores. Para evaluar la reactividad a la placa, se calculó el ratio existente entre el índice gingival y el índice de placa (G/P)(Kinbby et al. 1996). A partir del valor obtenido en este ratio (G/P) en el segundo trimestre se formaron dos grupos, “High-reacting” (HR) (Grupo alta reactividad) y “Low-reacting” (LR) (Grupo baja reactividad), en función de si el valor G/P estaba por encima o bien por debajo de la media respectivamente.

Para evaluar el efecto del tiempo sobre las variables evaluadas (clínicas e inmunológicas) se empleó el test de medidas repetidas de ANOVA y el test de Friedman para variables paramétricas y no paramétricas respectivamente. Para determinar las diferencias intra-grupo se realizaron comparaciones post hoc. Las correlaciones entre variables se establecieron con el test de Pearson (variables paramétricas) y el test de Spearman (variables no paramétricas).

Para aquellas variables en las cuales los resultados no fueron estadísticamente significativos, se realizó un análisis de la diferencia mínima detectable durante embarazo y postparto con el programa Sample Power 2.0.

Las variables sociodemográficas se analizaron mediante el test de chi-cuadrado, a excepción de la edad, la cual fue evaluada con el test t-student.

Las comparaciones intergrupo se realizaron con el test t-student y test U de Mann-Whitney para tests paramétricos y no paramétricos respectivamente. Las comparaciones entre los grupos HR y LR se realizaron con el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

## **ESTUDIO 2**

Los recuentos por especie de los diferentes patógenos periodontales presentes en las placas fueron contabilizados mediante estereomicroscopio (SDZ-PL, KYowa Optical. Ltd.). El total de patógenos anaerobios presentes en las muestras fue calculado a partir de los recuentos totales presentes en las placas de agar, multiplicado por el factor de dilución. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Tras la identificación, las proporciones de los diferentes patógenos también fue calculada como porcentaje en relación al total de unidades formadores de colonias anaerobias presentes en la muestra.

Las diferencias intragrupo longitudinales en los recuentos y proporciones de patógenos fueron evaluadas mediante el test de Friedman, equivalente no paramétrica del test de ANOVA. Las comparaciones post hoc para evaluar las diferencias intragrupo fueron realizadas mediante la corrección de Bonferroni.

La frecuencia de detección del patógeno se obtuvo transformando los datos en variables categóricas y empleando el test de Mc Nemar para las diferencias intergrupo, mientras que el test de Chi-cuadrado fue utilizado para evaluar las diferencias intergrupo. La correlación entre variables fue realizada con el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, para analizar la correlación de las variables microbiológicas con las variables clínicas y hormonales.

Para analizar posibles diferencias en el índice gingival en función de la presencia (pacientes positivos) o ausencia (pacientes negativos) de los diferentes patógenos periodontales se empleó el test U de Mann-Whitney. En este análisis se incluyeron las variaciones en el índice de placa como posible co-factor del índice gingival.

Para determinar diferencias entre el grupo embarazo y el grupo no embarazo se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, test validado para la comparación dos muestras independientes.



## ESTUDIO 3

### *Análisis de IL-6 y TNF- $\alpha$*

Los mediadores inflamatorios (IL- 6 y TNF- $\alpha$ ) se expresaron en cantidad (pg) y concentración (ng/ml). Para complementar el análisis inmunológico se analizó el índice de placa así como el índice gingival de las localizaciones específicas en las que se tomó la muestra de FCG (sPII y sGI).

Tras aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad se comprobó que no se alcanzaba rigurosamente para todos los tiempos evaluados a lo largo del embarazo, por lo se emplearon tests no paramétricos. Los datos se expresaron en mediana y rango intercuartil. Las diferencias intra-grupo para evaluar los cambios a lo largo del tiempo se realizaron con el test de Friedman. Las comparaciones post hoc se realizaron con el test de Bonferroni.

Las comparaciones intergrupo fueron analizadas con el test U de Mann-Whitney.

### *Análisis CHAID exhaustivo*

Con el objetivo de identificar variables predictoras que puedan explicar el incremento de la inflamación gingival durante el embarazo, se analizó la influencia de los diferentes factores etiológicos analizados en este estudio mediante un análisis multivariante. Se escogió un análisis de segmentación, aplicando el test CHAID exhaustivo (Chi-Square automatic interaction detector), dado que ofrece la capacidad de combinar variables categóricas y continuas. Se trata de un test no paramétrico basado en algoritmos que clasifica las variables independientes en variables predictoras de una variable dependiente. El índice gingival (GI) se estableció como la variable dependiente, mientras que las variables independientes evaluadas fueron: (i) clínicas (PII), (ii) socio-demográficas (edad, nivel educacional, profesión, frecuencia de cepillado, frecuencia de visita al dentista y autopercepción del estado de salud oral), (iii) inmunológicas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2) y (iv) microbiológicas (recuentos totales y recuentos específicos de los siguientes patógenos: *P. intermedia/nigrescens*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *E. corrodens*, *C. rectus* y *Capnocythopaga* sp). La significación del análisis de segmentación se realizó empleado el test de Bonferroni.

Los resultado del análisis CHAID exhaustivo se representan en árboles de decisiones, los cuales aportan una visión jerárquica de las interacciones de las variables predictoras. Las variables independientes que resultaron significativas se clasifican en nodos. La variable con la significación estadística más próxima a la variable dependiente se representa como primer nodo. Las subsiguientes asociaciones se clasifican en nodos consecutivos.

Las segmentaciones de los nodos se realizaron bajo los siguientes criterios: la profundidad máxima del árbol se estableció en 3 niveles, y el número mínimo de casos por nodo fue de 10. Para los nodos filales, el número mínimo de casos se estableció en el 10% del tamaño muestral.

# RESULTADOS

## 7.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

### Grupo embarazo

Sesenta mujeres fueron invitadas a participar en el presente estudio, de las cuales 48 aceptaron su participación en el estudio y 42 completaron las tres visitas realizadas durante el embarazo.

Los motivos de pérdida de pacientes durante el embarazo fueron los siguientes:

- Aborto espontáneo (3 pacientes).
- Parto prematuro (1 paciente).
- Aislamiento por tuberculosis (1 paciente).
- Razones personales (falta de motivación/interés) (1 paciente).

Tras el parto, un total de 26 pacientes completaron el estudio (Fig. 1). El motivo de la pérdida de 16 pacientes entre la tercera y cuarta visita fue debido a motivos personales (falta de tiempo/interés tras el nacimiento del neonato).

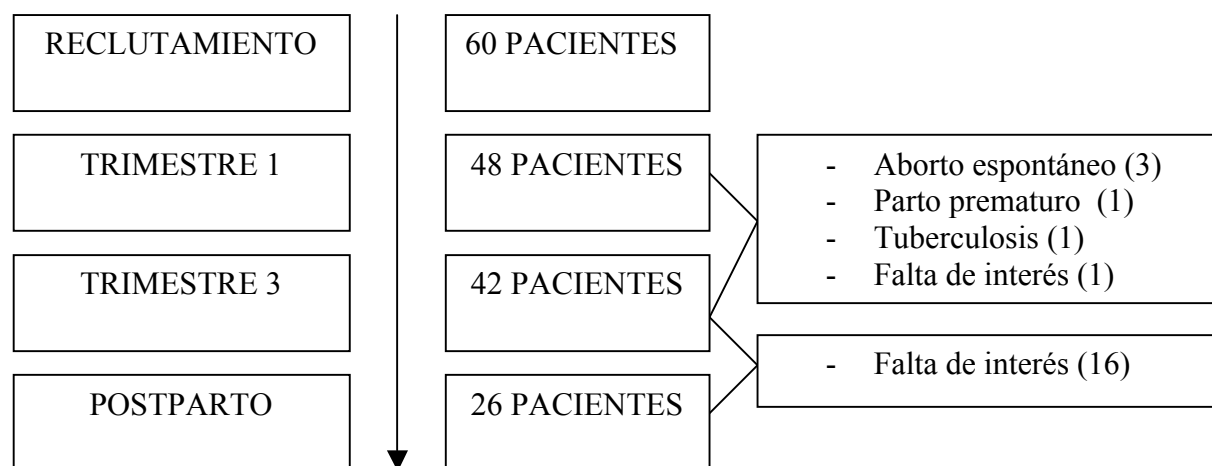


Figura 10. Esquema del seguimiento de las pacientes del grupo embarazo a lo largo del estudio.

Para el control del sesgo de seguimiento, todas las causas o motivos de pérdida de pacientes fueron identificadas con el objetivo de controlar que las pérdidas no influyeran o alteraran los resultados del estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas entre el grupo de 42 y 26 pacientes gestantes (Test de Friedman).

### Grupo no embarazo

Treinta mujeres no embarazadas que cumplieron los criterios de inclusión / exclusión fueron invitadas a participar en el estudio, de las cuales 28 aceptaron participar voluntariamente. Tras seis meses de seguimiento, se perdieron 8 pacientes, por lo que un total de 20 pacientes completaron el seguimiento.

Los motivos de pérdida de pacientes del grupo no embarazo fueron los siguientes:

- Comienzo de toma de anticonceptivos ( 4 pacientes)
- Razones personales (falta de motivación/interés) (4 pacientes).

Las pacientes perdidas fueron excluidas del análisis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas entre el grupo de 28 y 20 pacientes no embarazadas (Test de Friedman).

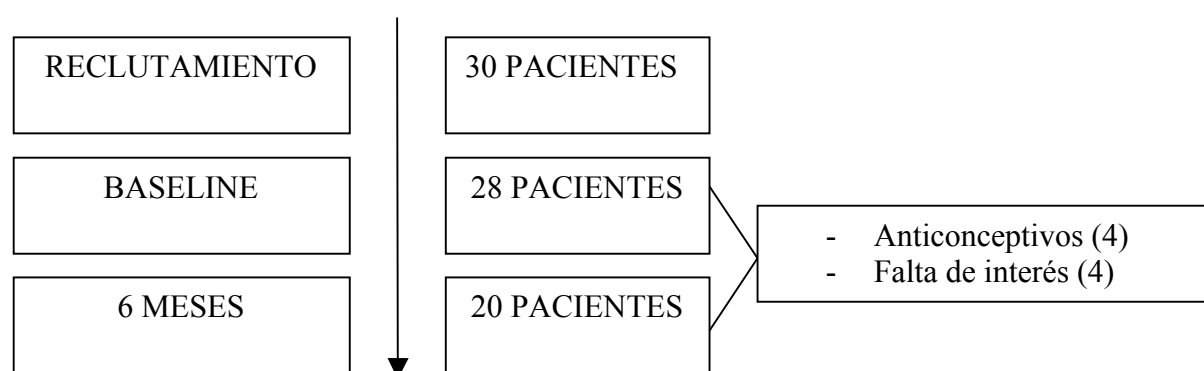


Figura 11. Esquema del seguimiento de las pacientes del grupo no embarazo a lo largo del estudio.

## 7.2. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS

Los resultados del análisis sociodemográfico muestran que el grupo embarazo presentó diferencias significativas frente al grupo no embarazo en relación a la edad (30.15 años en el grupo embarazo, 24-38 años en el grupo control), nivel educacional (menor porcentaje de estudios universitarios), profesión (mayor porcentaje de amas de casa y empleadas) y peor auto percepción del grado de salud oral percibido (tabla 32). Por el contrario, los grupos fueron comparables en las variables frecuencia de cepillado y atención dental recibida.

	Grupo embarazo	Grupo no embarazo
Edad	30.15 años (20-35)	24.38 años (22-26) $p<0.05$
Nivel educacional		
Sin estudios	1.9 %	0%
Estudios primaria	7.4%	0%

Estudios secundaria	50 %	3.8 %	p<0.05
Estudios universitarios	40.7 %	96.2 %	
Profesión			
Ama de casa	23.22 %	0 %	
Empleadas	60.7 %	15.5 %	
Profesión liberal	16.1 %	61.5 %	NS
Estudiantes	0 %	23.1 %	
Frecuencia de cepillado			
3 veces/día	59.6 %	76.9 %	
2 veces/día	31.6 %	23.2 %	
Una vez/día	7 %	0%	NS
< 1 vez/día	1.8 %	0 %	
Última visita dentista			
< 1 año	23.1 %	28.1 %	
1 año	65.4 %	47.4 %	
> 1 año	11.5 %	24.6 %	p<0.05
Auto-percepción salud oral*			
Mala	10.5 %	3.8 %	
Normal	40.4 %	7.7 %	
Buena	49.1 %	88.5 %	

Tabla 32. Descripción demográfica de la población de estudio.  $\chi^2$  para todos los parámetros exceptuando la edad (test t-student). \*p<0.05. NS, no significativo.

## 7.3. ESTUDIO I

### 7.3.1. RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EMBARAZO Y POSTPARTO

#### 7.3.1.1. Variables clínicas

##### *Índice de placa*

Durante el embarazo se observó una leve disminución del índice de placa respecto al primer trimestre, mientras que tras el parto se produjo un incremento en este parámetro. Estos cambios no fueron singificativos para ningún trimestre al realizar el análisis de boca completa y de dientes posteriores. Solamente se observó significación estadística para el incremento experimentado por el grupo de dientes anteriores desde el tercer trimestre hasta la evaluación postparto (Tabla 13).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Boca completa	0.71 (0.43)	0.65 (0.33)	0.68 (0.30)	0.72 (0.28)
Dientes anteriores	0.66 (0.46)	0.60 (0.36)	0.61 (0.35)	0.68 (0.33)*
Dientes posteriores	0.75 (0.43)	0.69 (0.36)	0.73 (0.29)	0.76 (0.28)

Tabla 13. Evolución longitudinal del índice de placa en el grupo embarazo. Comparación intragrupo. Test de ANOVA. \*p<0.05.

En relación al porcentaje de superficies con presencia de placa, fue de 52.97% en el primer trimestre, se redujo a 49.31% en el segundo trimestre e incrementó en el tercer trimestre (52.67%). A los 3 meses tras el parto, el porcentaje de placa fue de 57.82%.

##### *Índice gingival*

El índice gingival incrementó del primer al segundo trimestre, se mantuvo elevado en el tercer trimestre y descendió postparto. Estas diferencias fueron significativas para el análisis de boca completa y dientes anteriores en el segundo trimestre, mientras que para los dientes posteriores las diferencias no fueron significativas (Tabla 14).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Boca completa	1.01 (0.41)	1.13 (0.43)*	1.14 (0.44)	0.98 (0.40)
Dientes anteriores	0.95 (0.50)	1.12 (0.50)*	1.10 (0.54)	0.93 (0.39)
Dientes posteriores	1.96 (0.40)	1.14 (0.42)	1.16 (0.43)	1.02 (0.45)

Tabla 14. Evolución longitudinal del índice gingival en el grupo embarazo. Comparación intragrupo. Test de ANOVA. \*p<0.05.

### **Reactividad gingival a la placa (G/P)**

Para evaluar la reactividad del índice gingival a la placa se analizó el cociente índice gingival/índice de placa (G/P) (Kinnby et al. 1996). El valor obtenido con el ratio fue de 1.42, 1.74, 1.88 y 1.36 para el primer, segundo, tercer trimestre y postparto respectivamente. El incremento de este parámetro fue significativo en el segundo trimestre (p<0.01), mientras que a los 3 meses postparto las diferencias desaparecieron también de forma significativa.

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
General	1.70 (0.86)	1.93 (0.72)**	1.85 (0.78)	1.53 (0.99)***
Grupo Alta reactividad	1.85 (0.80)	2.46 (0.59)***	2.17 (0.85)	1.72 (1.25)**
Grupo Baja reactividad	1.55 (0.92)	1.39 (0.35)	1.52 (0.56)	1.27(0.38)

Tabla 15. Reactividad gingival a la placa (GI/PII; medis (DE) en los grupos embarazo y no embarazo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.001.

### **7.3.1.2. Variables hormonales. Niveles de hormonas sexuales esteroideas en saliva.**

Las concentraciones de progesterona y estradiol incrementaron significativamente durante el embarazo, con un pico máximo en el tercer trimestre, y reducción postparto (Tabla 16).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto



	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Progesterona	249.75 (196.03)	545.14 (344.83)**	1543.1 (760.38)***	11.11 (20.16)***
Estradiol	0.96 (2.56)	4.94 (12.35)*	24.38 (32.12)*	0.02 (0.09)***

Tabla 16. Niveles de progesterona y estradiol (media (SD)) en saliva (pg/ml) del grupo embarazo. Comparación intragrupo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \*p<0.05, \*\* p< 0.001, \*\*\* p< 0.0001.

### 7.3.1.3. Variables inmunológicas (IL-1B Y PGE2)

Debido a problemas técnicos de laboratorio, PGE2 sólo pudo determinarse en 23 mujeres durante el embarazo y 14 en la visita postparto.

#### IL-1β

No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-1 β (cantidad y concentración) durante el embarazo (tabla 32). El análisis estadístico reveló que la diferencia mínima detectable en cuanto a cantidad es de 10.55 pg para el incremento entre el primer y segundo trimestre, y de 9.02 pg para el cambio del segundo al tercer trimestre.

En la visita postparto, IL-1β disminuyó significativamente tanto en cantidad como en concentración.

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre (n=42)	2 <sup>nd</sup> trimestre (n=42)	3 <sup>rd</sup> trimestre (n=42)	Postparto (n=26)
Cantidad (pg)	30.05 (27.05)	23.28 (22.98)	30.45 (24.61)	17.46 (16.64)*
Concentración (ng/ml)	73.12 (57.93)	70.71 (69.68)	85.27 (69.66)	51.78 (53.58)*

Tabla 17. Niveles de IL-1β (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival del grupo embarazo. Comparación intragrupo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \*p<0.05

#### PGE2

Durante el embarazo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de PGE2 (cantidad y concentración (tabla 33). El análisis estadístico reveló que la diferencia mínima detectable en cuanto a cantidad es de 4.21 pg para el incremento entre el primer y segundo trimestre, y de 12.49 pg para el cambio del segundo al tercer trimestre.

En la visita postparto, los valores de concentración de PGE2 disminuyeron de forma significativa. Para la cantidad de PGE2, las diferencias postparto no fueron significativas (Tabla 18).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Cantidad (pg)	30.05 (27.05)	23.28 (22.98)	30.45 (24.61)	17.46 (16.64)*
Concentración (ng/ml)	73.12 (57.93)	70.71 (69.68)	85.27 (69.66)	51.78 (53.58)*

*Tabla 18.* Niveles de PGE2 (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival del grupo embarazo. Comparación intragrupo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \*p<0.05

### 7.3.2. COMPARATIVA DEL GRUPO EMBARAZO CON EL GRUPO NO EMBARAZO

El grupo no embarazo no presentó ninguna diferencia entre las dos visitas realizadas (intervalo de 6 meses) en las variables clínicas, hormonales e inmunológicas.

#### Variables clínicas

##### *Índice de placa*

La tabla 19 muestra la comparación inter-grupo del grupo embarazo y del grupo no embarazo. Al analizar las diferencias intergrupo se observó una tendencia a la presencia de mayor cantidad de placa en el grupo embarazo. Las diferencias fueron significativas en la comparación tercer trimestre con la visita 2 del grupo no embarazo. No hubo diferencias en las localizaciones anteriores

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Boca completa	0.71 (0.43)	0.65 (0.33)	0.68 (0.30)*	0.72 (0.28)
Dientes anteriores	0.66 (0.46)	0.60 (0.36)	0.61 (0.35)	0.68 (0.33)
Dientes posteriores	0.75 (0.43)	0.69 (0.36)	0.73 (0.29)	0.76 (0.28)

	Grupo no embarazo	
	Basal (n=20)	6 meses (n=20)
Boca completa	0.53 (0.31)	0.50 (0.23)*
Dientes anteriores	0.50 (0.43)	0.46 (0.26)
Dientes posteriores	0.56 (0.26)	0.54 (0.25)

Tabla 19. Comparación inter-grupo del índice de placa entre el grupo embarazo y grupo no embarazo. Test ANOVA. \*p<0.05

### ***Índice gingival***

En la tabla 34 se muestra la evolución intragrupo del índice gingival. En la comparación intergrupo, el índice gingival fue estadísticamente superior en el grupo embarazo en comparación con el grupo no embarazo, tanto en boca completa, como en dientes anteriores y dientes posteriores. Las diferencias fueron significativas en la comparativa primer trimestre-basal, como en tercer trimestre-6 meses.

	Grupo embarazo			
	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Boca completa	1.01 (0.41)*	1.13 (0.43)	1.14 (0.44)*	0.98 (0.40)

Dientes anteriores	0.95 (0.50)*	1.12 (0.50)	1.10 (0.54)*	0.93 (0.39)
Dientes posteriores	1.96 (0.40)*	1.14 (0.42)	1.16 (0.43)*	1.02 (0.45)
<b>Grupo no embarazo</b>				
	Basal (n=20)	6 meses (n=20)		
Boca completa	0.65 (0.44)*	0.58 (0.28)*		
Dientes anteriores	0.64 (0.47)*	0.47 (0.30)*		
Dientes posteriores	0.65 (0.43)*	0.66 (0.29)*		

Tabla 20. Comparación inter-grupo del índice gingival en el grupo embarazo y grupo no embarazo. Test ANOVA. \*p<0.05

### ***Reactividad gingival a la placa (GI/PII)***

La reactividad del índice gingival a la placa (GI / PII) fue también mayor en el grupo embarazo en el primer y tercer trimestre en comparación con el grupo no embarazo, mientras que postparto las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

<b>Grupo embarazo</b>				
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
General	1.70 (0.86)*	1.93 (0.72)	1.85 (0.78)*	1.53 (0.99)
<b>Grupo no embarazo</b>				
	Basal	6 meses		
	(n=20)	(n=20)		
General	1.35 (0.76)*	1.23 (0.54)*		

Tabla 21. Comparación inter-grupo del índice GI/PII en el grupo embarazo y grupo no embarazo. Test ANOVA. \*p<0.05

### ***Comparación postparto con el grupo no-embarazo***

A los tres meses postparto, hubo diferencias significativas entre ambos grupos en el índice de placa ( $p=0.008$ ) y el índice gingival ( $p=0.001$ ), siendo los valores más elevados en el grupo control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas para la reactividad gingival a la placa (G/P) ( $p > 0.005$ )

### Variables hormonales

Los niveles de hormonas sexuales esteroideas evaluados (estrógeno y progesterona) fueron significativamente mayores en el grupo embarazo en comparación con las visitas basal y 6-meses del grupo no embarazo. A los 3 meses postparto las diferencias con el grupo control desaparecen (ES)(Tabla 22).

Grupo embarazo				
	1 <sup>er</sup> trimestre (n=42)	2 <sup>o</sup> trimestre (n=42)	3 <sup>er</sup> trimestre (n=42)	Postparto (n=26)
Progesterona	249.75 (196.03)*	545.14 (344.83)*	1543.1 (760.38)*	11.11 (20.16)
Estradiol	0.96 (2.56)*	4.94 (12.35)*	24.38 (32.12)*	0.02 (0.09)
Grupo no embarazo				
	Basal (n=20)		6 meses (n=20)	
Progesterona	20.63 (30.12)*		40.03 (9.12)*	
Estradiol	0.01 (0.06)*		0.01 (0.04)*	

Tabla 22. Niveles de progesterona y estradiol (media (SD)) en saliva (pg/ml) del grupo embarazo y grupo no embarazo. Comparación intragrupo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \* $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$ , \*\*\*  $p<0.0001$ .

### Variables inmunológicas (IL-1 $\beta$ y PGE2)

#### IL-1 $\beta$

Las mujeres embarazadas presentaron niveles significativamente superiores de IL-1 $\beta$  en comparación con el grupo control (tabla 23).

Grupo embarazo				
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto

	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Cantidad (pg)	30.05 (27.05)*	23.28 (22.98)	30.45 (24.61)*	17.46 (16.64)
Concentración (ng/ml)	73.12 (57.93)*	70.71 (69.68)	85.27 (69.66)*	51.78 (53.58)
<b>Grupo no embarazo</b>				
	Basal (n=20)		6 meses (n=20)	
Cantidad (pg)	3.66 (3.39)*		4.54 (5.90)*	
Concentración (ng/ml)	14.00 (18.13)*		12.00 (10.69)*	

Tabla 23. Niveles de IL-1 $\beta$  (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival. Comparación inter-grupo. Test U de Mann Whitney. \*p<0.05

## PGE2

No se observaron diferencias significativas entre el grupo embarazo y el grupo control en los valores de PGE2 (Tabla 24).

	<b>Grupo embarazo</b>			
	1 <sup>st</sup> trimestre (n=42)	2 <sup>nd</sup> trimestre (n=42)	3 <sup>rd</sup> trimestre (n=42)	Postparto (n=26)
Cantidad (pg)	30.05 (27.05)	23.28 (22.98)	30.45 (24.61)	17.46 (16.64)
Concentración (ng/ml)	73.12 (57.93)	70.71 (69.68)	85.27 (69.66)	51.78 (53.58)
<b>Grupo no embarazo</b>				
	Basal (n=20)		6 meses (n=20)	
Cantidad (pg)	3.66 (3.39)		4.54 (5.90)	
Concentración (ng/ml)	14.00 (18.13)		12.00 (10.69)	

Tabla 24. Niveles de PGE2 (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival. Comparación inter-grupo. Test U de Mann Whitney. \*p<0.05

## ESTUDIO II

### RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EMBARAZO Y POSTPARTO

#### Variables microbiológicas

##### *Recuentos bacterianos totales de unidades formadoras de colonias (Ufc)*

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la flora total durante el embarazo ni a los tres meses tras el parto (Tabla 25).

La flora total anaeróbica fue de  $5.32 \times 10^5$ ,  $5.28 \times 10^5$  y  $5.03 \times 10^5$  ufc en el primer, segundo y tercer trimestre respectivamente. En la visita postparto, se mantuvo en  $5.02 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias.

	Grupo embarazo			
	1 trimestre	2 trimestre	3 trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=28)
Recuentos totales	$5.32 \times 10^5$	$5.28 \times 10^5$	$5.03 \times 10^5$	$5.02 \times 10^5$
Desviación estándar	$8.07 \times 10^5$	$8.30 \times 10^5$	$8.32 \times 10^5$	$9.50 \times 10^5$

Tabla 25. Recuentos anaeróbicos totales en unidades formadoras de colonias (Ufc) en mujeres embarazadas. Comparación intragrupo (Test de Friedman con corrección de Bonferroni). \*  $p < 0.05$ .

##### *Frecuencia de detección de patógenos*

En la tabla 26 se muestra la prevalencia que mostraron los patógenos evaluados en las muestras subgingivales a lo largo del embarazo. El patógeno hallado con mayor frecuencia fue *F. nucleatum* (rango del 88.10-97.62 %), seguido en orden decreciente por *P. intermedia* (47.62–66.67%), *P. micra* (42.86–50.00%), *P. gingivalis* (35.71–40.48%), *C. rectus* (11.90–14.29%), *A. actinomycetemcomitans* (9.52–21.43%) and *T. forsythia* (2.38-9.52%).

Tras analizar la tabla 26, se observa que la prevalencia de patógenos durante el embarazo fue relativamente estable, con una tendencia generalizada a la disminución en la detección tras el parto, la cual fue significativa para *A. actinomycetemcomitans* ( $p=0.039$ ).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14.29 % (6)	9.52 % (4)	21.43 % (9)	7.69 % (2)*
<i>P. gingivalis</i>	35.71 % (15)	40.48 % (17)	38.10 % (16)	26.92 % (7)
<i>P. intermedia</i>	61.90 % (26)	66.67 % (28)	47.62 % (20)	57.69 % (15)
<i>T. forsythia</i>	9.52 % (4)	2.38 % (1)	7.14 % (3)	7.69 % (2)
<i>P. micra</i>	50.00 % (21)	42.86 % (18)	47.62 % (20)	38.46 % (10)
<i>C. rectus</i>	11.90 % (5)	14.29 % (6)	14.29 % (6)	7.69 % (2)
<i>F. nucleatum</i>	97.62 % (41)	92.86 % (39)	88.10 % (37)	80.77 % (21)

Tabla 26. Frecuencia de detección de patógenos periodontales (porcentaje / número absoluto respecto al total de pacientes pertenecientes al grupo embarazo). \* =  $p<0.05$ , comparaciones intragrupo.

### **Proporción (%) de patógenos periodontales**

Las proporciones relativas de los diferentes patógenos periodontales identificados durante el embarazo y tras el parto quedan reflejados en la tabla 26. Los patógenos mostraron un patrón común durante el embarazo, caracterizado por un incremento progresivo durante la gestación, con un pico máximo en el segundo o bien en el tercer trimestre, dependiendo del patógeno. Los patógenos que presentaron en el segundo trimestre la proporción máxima fueron *P. intermedia* ( $3.13 \pm 8.80$  %), *P. micra* ( $3.27 \pm 7.15$  %), *C. rectus* ( $0.15 \pm 0.65$  %) y *F. nucleatum* ( $5.59 \pm 5.24$  %). Por el contrario, el pico máximo de proporción recayó en el tercer trimestre para *A. actinomycetemcomitans* ( $1.22 \pm 4.26$  %), *P. gingivalis* ( $8.12 \pm 17.19$  %) y *T. forsythia* ( $0.41 \pm 1.66$  %). El test no paramétrico de Friedman con corrección de Bonferroni no encontró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los cambios observados en las proporciones bacterianas a lo largo del embarazo.



Tras el parto, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. micra* y *F. nucleatum* mostraron un abrupto descenso, mientras que *P. intermedia* y *C. rectus* sufrieron un sobrecrecimiento. Los cambios del tercer trimestre a la visita postparto fueron significativos para todas las bacterias aplicando el test de Friedman con corrección de Bonferroni.

Especies bacterianas	1 <sup>st</sup> trimestre	2 <sup>nd</sup> trimestre	3 <sup>rd</sup> trimestre	Postparto
Proporción relativa (SD)	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	0.30 (1.47)	1.02 (6.10)	1.22 (4.26)	0.08** (0.41)
<i>P.gingivalis</i>	5.69 (12.17)	4.55 (8.76)	8.12 (17.19)	2.74** (8.13)
<i>P.intermedia</i>	2.37 (5.13)	3.13 (8.80)	2.55 (9.91)	3.83* (8.64)
<i>T.forsythia</i>	0.46 (2.16)	0.01 (0.04)	0.41 (1.66)	0.03* (0.14)
<i>P. micra</i>	2.66 (7.47)	3.27 (7.15)	2.06 (4.82)	1.95** (3.71)
<i>C. rectus</i>	0.07 (0.29)	0.15 (0.65)	0.13 (0.62)	0.26** (1.12)
<i>F. nucleatum</i>	5.38 (7.52)	5.59 (5.24)	5.38 (7.09)	4.01** (4.04)

Tabla 27. Evaluación longitudinal de los patógenos subgingivales durante el embarazo y 3 meses postparto (comparación intra-grupo). Test de Friedman con corrección de Bonferroni.

\* = p<0.05; \*\* = p<0.01.

En orden decreciente en relación a las proporciones presentadas, los patógenos con mayor presencia en la flora total anaerobia fueron *P. gingivales* y *F. nucleatum* (< 10%), seguido de *P. intermedia*, *P. micra* y *A. actinomycetemcomitans* (< 5%) y por último, en porcentaje menor al 1 % se encontraron *C. rectus* y *T. forsythia* (Figuras 12-14).

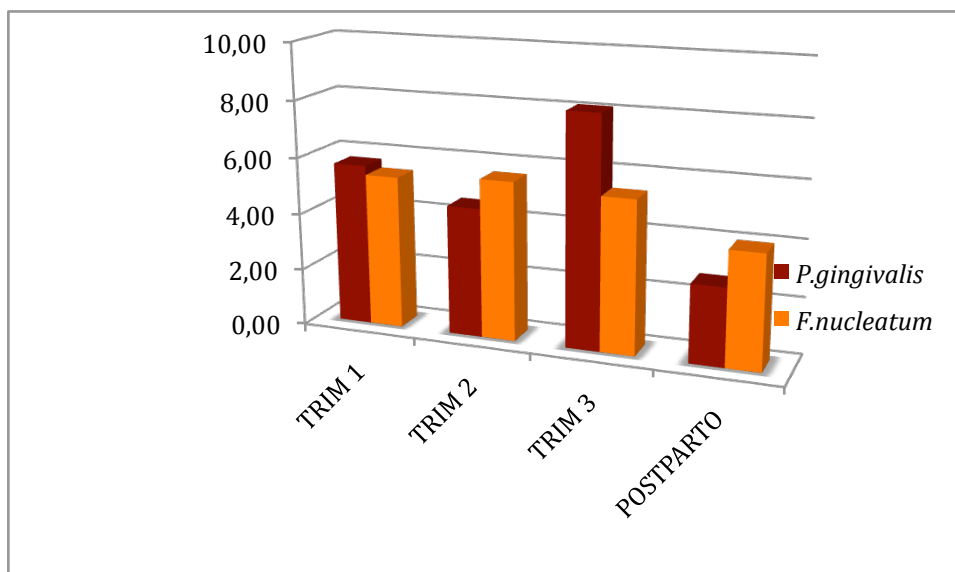


Figura 12. Patógenos periodontales con proporciones <10% respecto a la flora total. En este grupo se encontraron *P.gingivalis* y *F. nucleatum*.

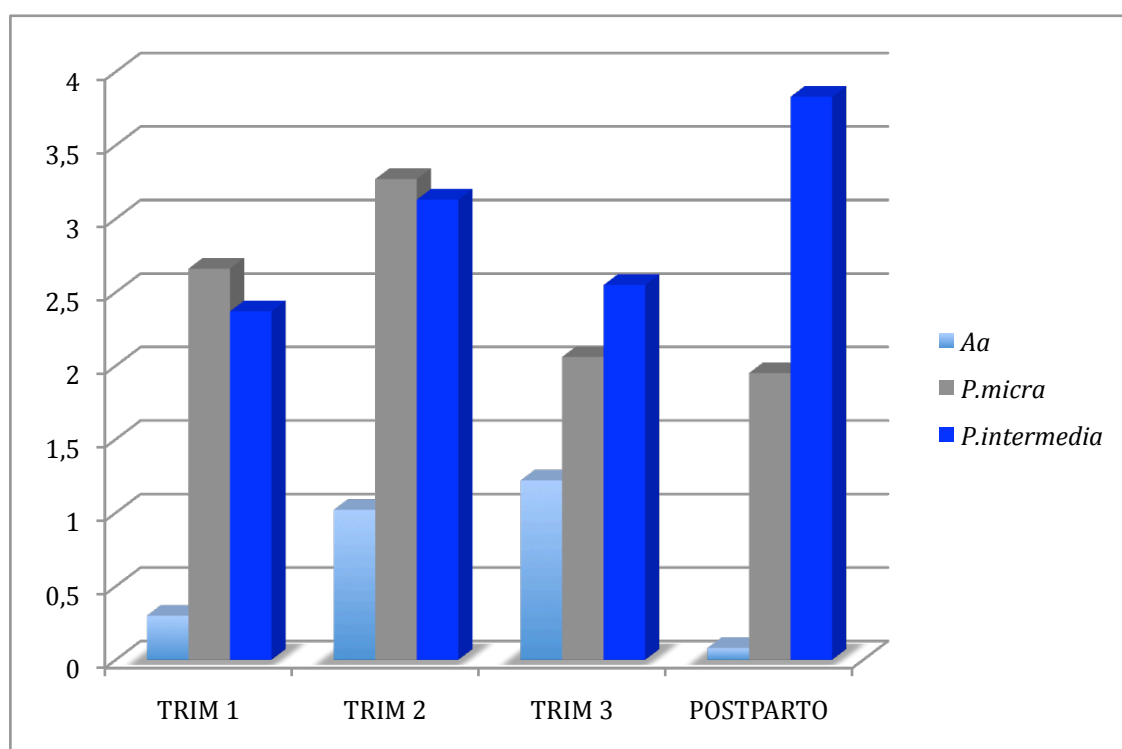


Figura 13. Patógenos periodontales con proporciones <5 % respecto a la flora total. En este grupo se encontraron *P.intermedia*, *P.micra* y *A.actinomyctemecomitans*.

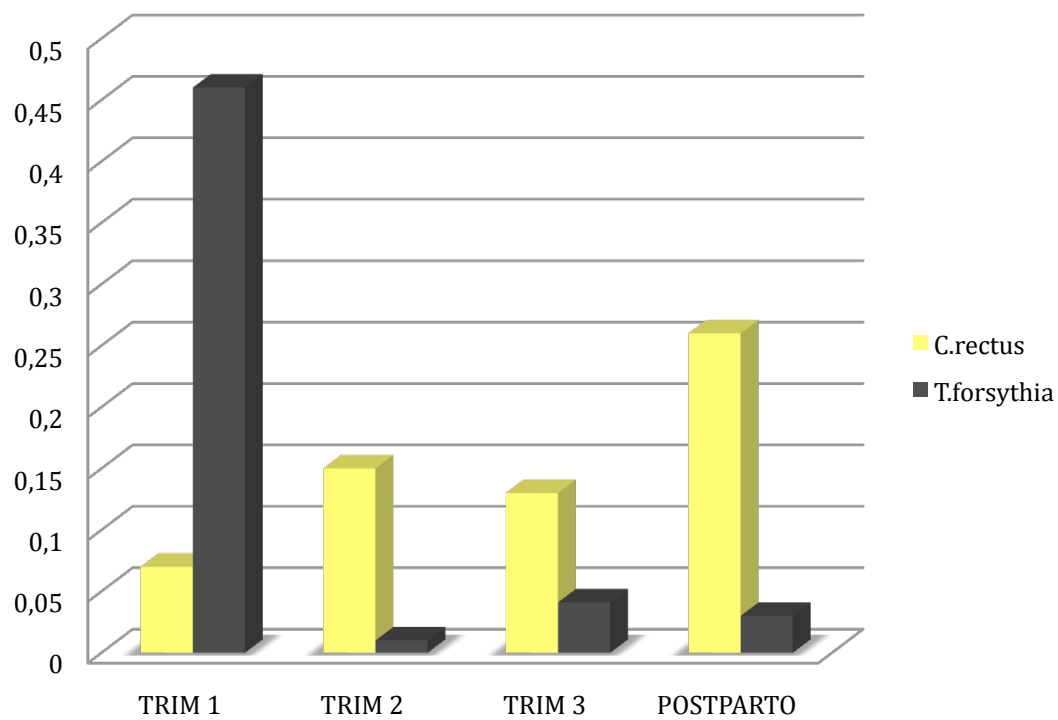


Figura 14. Patógenos periodontales con proporciones <1 % respecto a la flora total. En este grupo se encontraron *C.rectus* y *T.forsythia*.

### Proporciones en muestras positivas a las diferentes especies bacterianas

Para poder evaluar longitudinalmente el patrón microbiológico de las pacientes positivas, se formaron dos subgrupos de pacientes “positivas” y “negativas” según la presencia/ausencia del patógeno en el segundo trimestre (Herrera et al. 2008) (Tabla 28).

La frecuencia de detección varió según los diferentes patógenos, con un rango que osciló entre el 2.38 % para *T. forsythia* en el segundo trimestre hasta un 97.62% para *F. nucleatum* en el primer trimestre.

	Porcentaje medio (SD) en pacientes positivas			Friedman test  valor p	Valor p (Corrección Bonferroni)	
	1 trimestre	2 trimestre	3 trimestre		1 <sup>er</sup> vs 2 <sup>o</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> vs 3 <sup>er</sup> trimestre
<i>Aa</i>	2.24 (3.54)	10.80(19.18)	5.69** (8.03)	< 0.01	NS	0.01
<i>P.gingivalis</i>	14.94 (16.05)	11.25 (10.80)	20.07 (22.43)	NS	NS	NS
<i>P.intermedia</i>	3.99 (6.18)	5.47 (10.98)	5.43 (14.01)	NS	NS	NS
<i>T.forsythia</i>	4.84 (5.96)	0.26 (0.00)	5.77 (3.17)	NS	NS	NS
<i>P. micra</i>	4.88 (9.81)	6.18 (9.30)	4.55 *(6.32)	<0.05	NS	<0.05
<i>C. rectus</i>	0.65 (0.66)	1.29 (1.58)	1.04 (1.51)	NS	NS	NS
<i>F. nucleatum</i>	5.63 (7.56)	6.36 (5.13)	6.28 (7.28)	NS	NS	NS

Tabla 28. Proporción de patógenos periodontales durante el embarazo en pacientes positivas. Comparación intragrupo (test de Friedman con corrección de Bonferroni). \* = p<0.05; \*\* = p<0.01.

Las proporciones de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes positivas a este patógeno fueron de 2.24% en el primer trimestre, alcanzaron el pico máximo en el segundo trimestre (10.80%) y descendieron al 5.69 % en el tercer trimestre (p<0.05). Siguiendo el mismo patrón que *Aa*, las proporciones de *P.micra* en el subgrupo de pacientes positivas fueron del 4.88, 6.18 y 4.55 % en el primer, segundo y tercer trimestre respectivamente, siendo ES el descenso observado del segundo al tercer trimestre (p<0.05).

El resto de patógenos no mostraron DES en su patrón a lo largo del embarazo. A excepción *P. gingivalis* y *T. forsythia*, los porcentajes máximos se alcanzaron en el segundo trimestre. Las proporciones de *P. gingivalis* fueron del 14.94% en el primer trimestre, disminuyeron ligeramente a

11.25% en el segundo trimestre y alcanzaron el porcentaje máximo en el tercer trimestre de 20.07% ( $p=0.052$ ).

Las figuras 15-21 muestran la comparación de los diferentes patógenos entre el porcentaje presentado en relación a la flora total (patógeno global) y el porcentaje del patógeno en las muestras positivas. El patógeno que presentó mayores proporciones durante el embarazo en muestras positivas fue *P.gingivalis* (14.94-20.07%), seguido de *A. actinomycetamcomitans* (2.24-10.8%), *F. nucleatum* (5.63-6.28%), *P. micra* (4.88-6.18%), *P. intermedia/nigrescens* (3.99-5.47%), *T. forsythia* (0.26-5.77%) y *C. rectus* (0,65-1.29%).

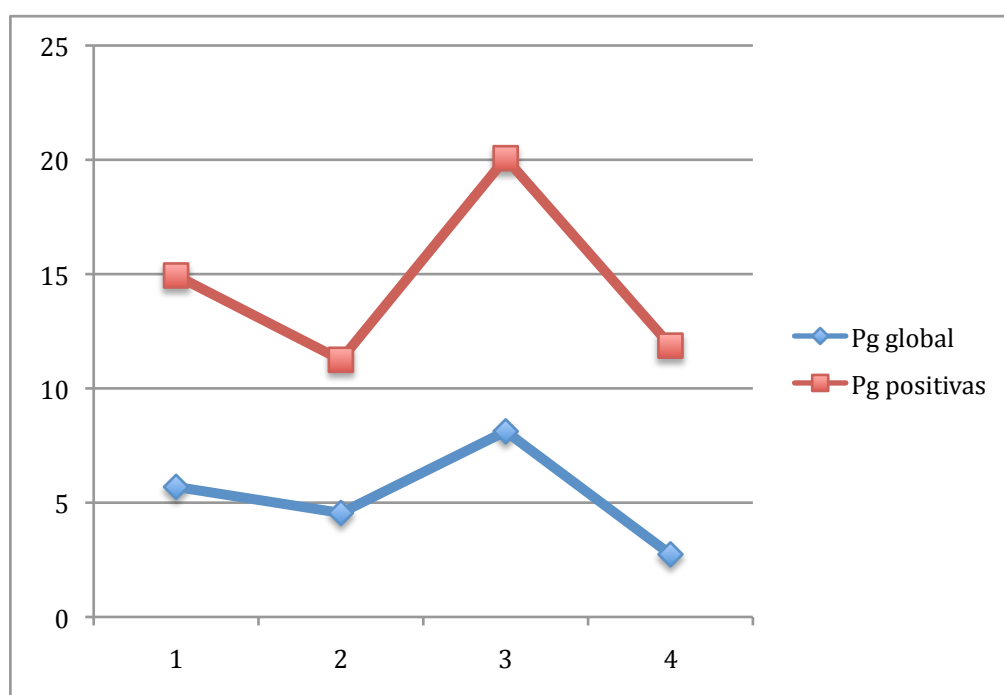


Figura 15. Representación del porcentaje presentado por *P. gingivalis* en pacientes positivas (Pg positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Pg global).

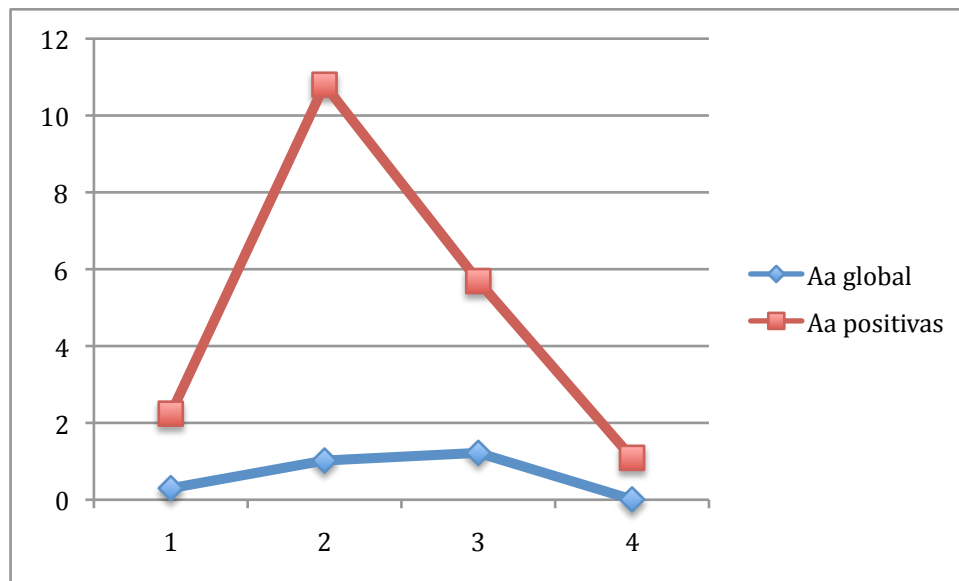


Figura 16. Representación del porcentaje presentado por *A. actinomycetemcomitans* en pacientes positivas (Aa positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Aa global).

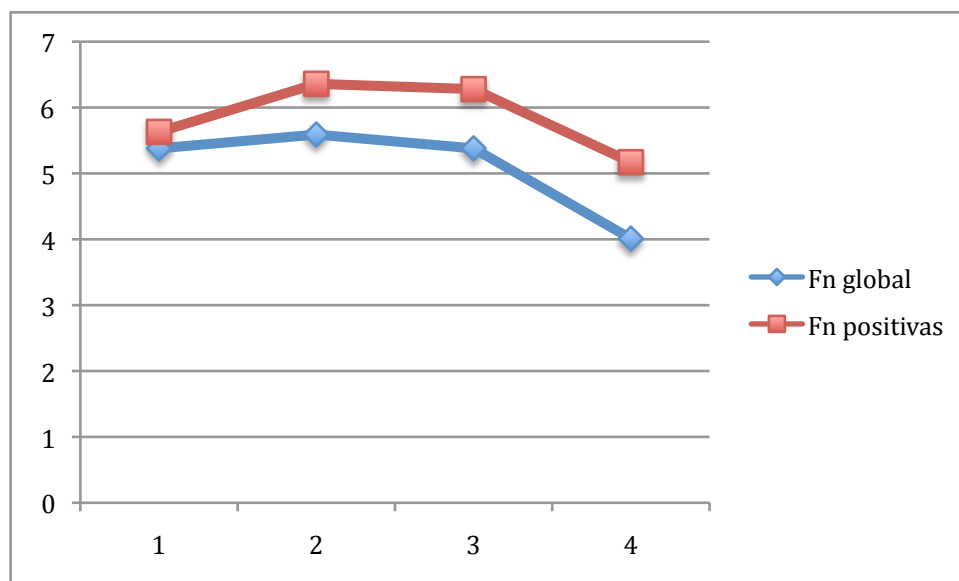


Figura 17. Representación del porcentaje presentado por *F. nucleatum* en pacientes positivas (Fn positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Fn global).

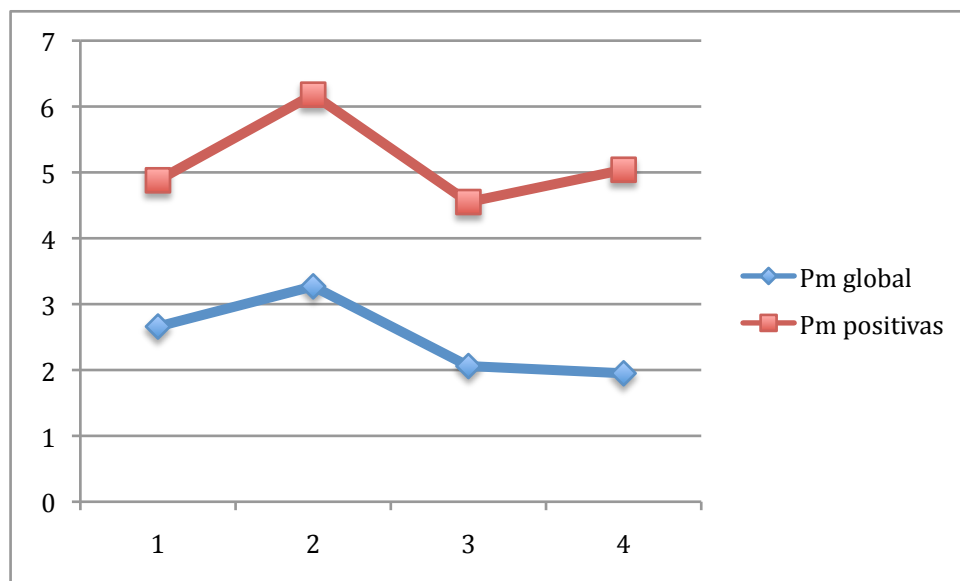


Figura 18. Representación del porcentaje presentado por *P. micra* en pacientes positivas (Pm positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Pm global).

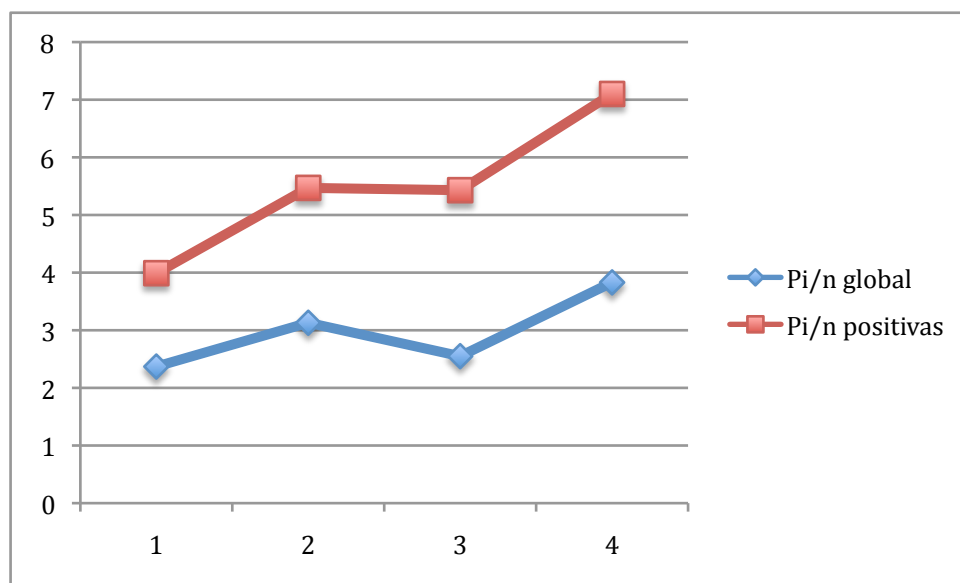


Figura 19. Representación del porcentaje presentado por *P. intermedia/nigrescens* en pacientes positivas (Pi/n positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Pi/n global).

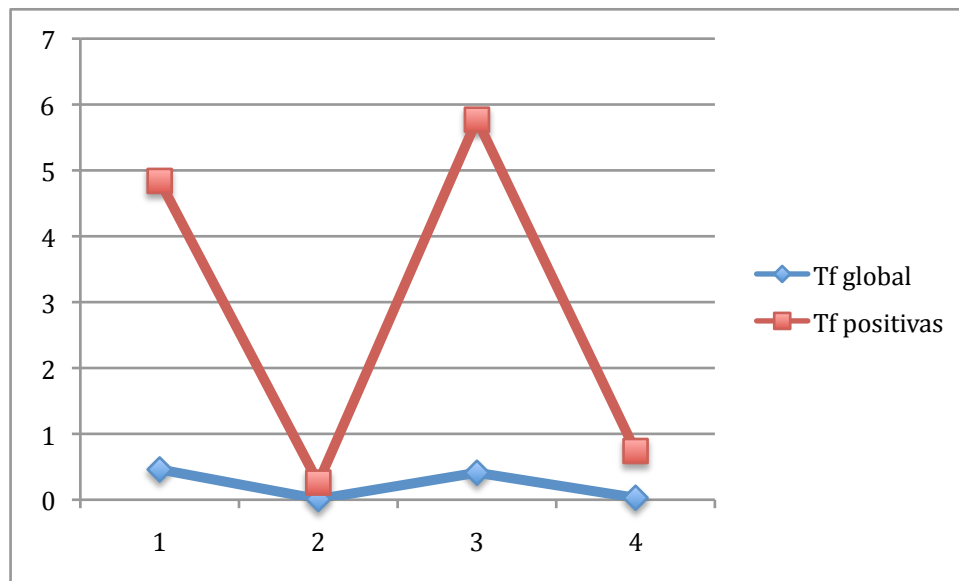


Figura 20. Representación del porcentaje presentado por *T. forsythia* en pacientes positivas (Tf positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Tf global).

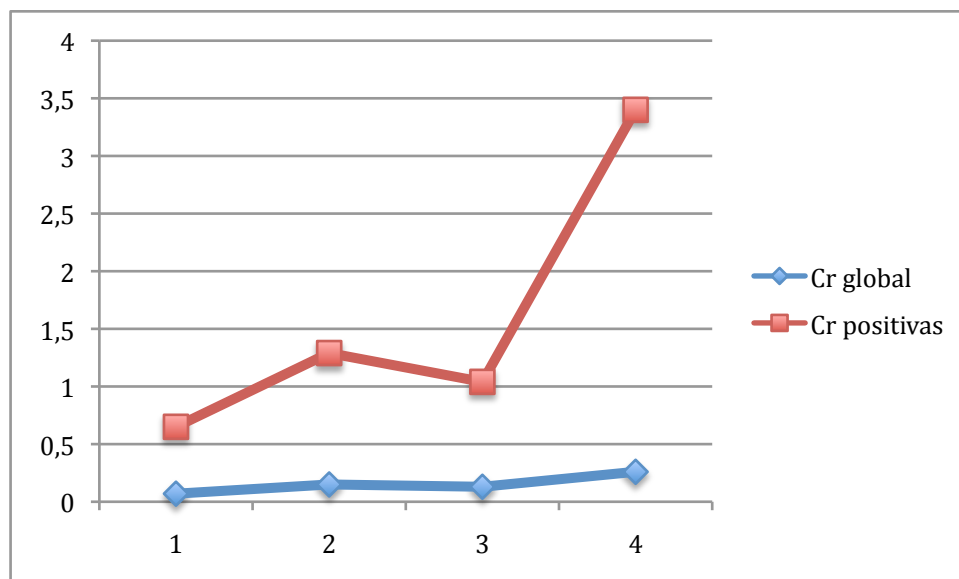


Figura 21. Representación del porcentaje presentado por *C. rectus* en pacientes positivas (Cr positivas) respecto al porcentaje presentado por el patógeno en relación a la flora total (Cr global).

### ***Inflamación gingival en pacientes patógeno-positivas.***

Se realizó una comparación entre las pacientes patógeno-positivas y pacientes patógeno-negativas para valorar posibles diferencias en la inflamación gingival entre ambos grupos. Posibles cambios en el IP fueron incluidos en el análisis para controlar el efecto del factor placa sobre el Índice Gingival.



Las especies bacterianas cuya presencia se asoció a un incremento en el índice gingival fueron *P. gingivalis* y *P. intermedia/nigrescens*. Los sujetos *P. gingivalis* positivos presentaron mayores niveles de inflamación gingival respecto a las pacientes cuya presencia no fue detectada mediante cultivo. Este hallazgo se detectó en todos los trimestres del embarazo, independiente del IP, siendo significativo el incremento en el segundo ( $p<0.001$ ) y tercer trimestre ( $p=0.009$ ). Por el contrario, tras el parto las diferencias entre ambos grupo desaparecieron. El IG fue de 1.34 (SD 0.34) en las paciente positivas frente a 0.98 (SD 0.45) en las pacientes negativas en el segundo trimestre, y de 1.35 (SD 0.34) frente a 0.98 (SD 0.46) en las pacientes positivas/negativas respectivamente en el tercer trimestre (Tabla 29).

		1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimestre	Postparto
PII	<i>P. gingivalis</i> +	0.78 (0.34)	0.74 (0.27)	0.75 (0.25)	0.79 (0.24)
	<i>P. gingivalis</i> –	0.67 (0.38)	0.60 (0.36)	0.61 (0.32)	0.69 (0.30)
GI	<i>P. gingivalis</i> +	1.10 (0.41)	1.34** (0.34)	1.35** (0.34)	0.90 (0.29)
	<i>P. gingivalis</i> –	0.94 (0.44)	0.98 (0.45)	0.98 (0.46)	0.99 (0.40)

Tabla 29. Inflamación gingival en pacientes *P. gingivalis* positivas (media (SD)). Los valores del índice de placa (PII) e índice gingival (GI) se representan según la presencia (pacientes positivas (+)) / ausencia (pacientes negativas (-)) de *Porphyromonas gingivalis* durante el embarazo (comparación intragrupo). \* =  $p<0.05$ ; \*\* =  $p<0.01$ .

En el caso de *P. intermedia/nigrescens*, el índice gingival fue significativamente mayor en el segundo trimestre para las pacientes positivas a este patógeno, aunque también se obtuvieron DES en el IP (Tabla 30).

		1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimestre	Postparto
PII	<i>P. intermedia</i> +	0.76 (0.41)	0.77* (0.34)	0.72 (0.33)	0.76 (0.30)
	<i>P. intermedia</i> –	0.67 (0.38)	0.47 (0.21)	0.62 (0.26)	0.66 (0.26)
GI	<i>P. intermedia</i> +	1.05 (0.44)	1.26* (0.42)	1.26 (0.47)	0.91 (0.44)
	<i>P. intermedia</i> –	0.92 (0.42)	0.94 (0.42)	1.01 (0.40)	1.04 (0.27)

Tabla 30. Inflamación gingival en pacientes *P. intermedia/nigrescens* positivas (media (SD)). Los valores del índice de placa (PII) e índice gingival (GI) se representan según la presencia (pacientes positivas (+)) / ausencia (pacientes negativas (-)) de *P. intermedia/nigrescens* durante el embarazo (comparación intragrupo). \* =  $p<0.05$ ; \*\* =  $p<0.01$ .

*A. actinomycetemcomitans* presentó una tendencia similar a *P.intermedia/nigrescens* en el primer trimestre, aunque las diferencias en el índice gingival no obtuvieron significación estadística ( $p=0.053$ ).

		1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>o</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimestre	Postparto
PI	Aa + (SD)	0.96 (0.34)*	1.10 (0.54)	0.86 (0.36)	0.80 (0.21)
	Aa - (SD)	0.66 (0.38)	0.60 (0.25)	0.61 (0.26)	0.71 (0.29)
GI	Aa + (SD)	1.30 (0.48)	1.28 (0.38)	1.32 (0.54)	1.25 (0.19)
	Aa - (SD)	0.94 (0.40)	1.12(0.45)	1.08 (0.41)	0.95 (0.38)

*Tabla 31.* Inflamación gingival en pacientes *A. actinomycetemcomitans* positivas (media (SD)). Los valores del índice de placa (PI) e índice gingival (GI) se representan según la presencia (pacientes positivas (+)) / ausencia (pacientes negativas (-)) de *A. actinomycetemcomitans* durante el embarazo (comparación intragrupo). \* =  $p<0.05$ ; \*\* =  $p<0.01$ .

### Correlaciones entre las variables clínicas, microbiológicas y hormonales.

El incremento en las concentraciones de progesterona en saliva del primer al segundo trimestre se correlacionó con *P.gingivalis* ( $r=0.357$ ;  $p=0.016$ ). También se observó una correlación positiva en ese estadio con el incremento en la inflamación gingival y el incremento en los niveles de *P.intermedia* ( $r=0.345$ ;  $p=0.020$ ). Del segundo al tercer trimestre del embarazo, la concentración de estradiol se correlacionó con el incremento de *P. gingivalis*.

## COMPARACIÓN GRUPO EMBARAZO-GRUPO NO EMBARAZO

### Variables microbiológicas

#### *Recuentos bacterianos totales*

Los recuentos bacterianos totales tendieron a ser mayores en el grupo embarazo en comparación con el grupo no embarazo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en la comparación del primer trimestre con la visita basal del grupo no embarazo, mientras que no hubo diferencias entre el tercer trimestre del embarazo y la visita 6 meses del grupo control. La evolución intragrupo de ambos grupo se muestra en la tabla 32.

### Grupo embarazo

	1 trimestre (n=42)	2 trimestre (n=42)	3 trimestre (n=42)	Postparto (n=28)
Recuentos totales	5.32 x 10 <sup>5</sup>	5.28 x 10 <sup>5</sup>	5.03 x 10 <sup>5</sup>	5.02 x 10 <sup>5</sup>
Desviación estándar	8.07 x 10 <sup>5</sup>	8.30 x 10 <sup>5</sup>	8.32 x 10 <sup>5</sup>	9.50 x 10 <sup>5</sup>
<b>Grupo no embarazo</b>				
	Basal (n=20)	6 meses (n=20)		
Recuentos totales	4.96 x 10 <sup>5</sup>	4.63 x 10 <sup>5</sup>		
Desviación estándar	8.45 x 10 <sup>5</sup>	8.69 x 10 <sup>5</sup>		

Tabla 32. Comparación intragrupo de los recuentos bacterianos totales en el grupo embarazo y grupo no embarazo. Test friedman con corrección de Bonferroni. \*p<0.05

### ***Frecuencia de detección de patógenos periodontales***

La tabla 33 describe la frecuencia de detección de patógenos en los grupos embarazo y no embarazo. Al realizar la comparación intergrupo, todos los patógenos presentaron la tendencia a presentarse con mayor frecuencia en el grupo embarazo. En el análisis primer trimestre embarazo-basal grupo control solamente *P.intermedia* presentó una frecuencia de detección superior en el grupo embarazo. Por el contrario, en la comparativa tercer trimestre embarazo-6meses grupo control se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. En el tercer trimestre, *A. actinomycetemcomitans* se detectó en un 21.43% de los casos, mientras que en el grupo no embarazo no fue detectado en ningún paciente en la visita 6 meses. En el caso de *P.gingivalis*, se detectó en el 38.10% de las gestantes del tercer trimestre frente al 5% de la visita 6 meses del grupo control.

<b>Grupo embarazo</b>				
	1 <sup>st</sup> trimestre (n=42)	2 <sup>nd</sup> trimestre (n=42)	3 <sup>rd</sup> trimestre (n=42)	Postparto (n=26)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14.29 % (6)	9.52 % (4)	21.43 % (9)*	7.69 % (2)

<i>P. gingivalis</i>	35.71 % (15)	40.48 % (17)	38.10 % (16)	26.92 % (7)
<i>P. intermedia</i>	61.90 % (26)	66.67 % (28)	47.62 % (20)	57.69 % (15)
<i>T. forsythia</i>	9.52 % (4)	2.38 % (1)	7.14 % (3)	7.69 % (2)
<i>P. micra</i>	50.00 % (21)	42.86 % (18)	47.62 % (20)	38.46 % (10)
<i>C. rectus</i>	11.90 % (5)	14.29 % (6)	14.29 % (6)	7.69 % (2)
<i>F. nucleatum</i>	97.62 % (41)	92.86 % (39)	88.10 % (37)	80.77 % (21)

Grupo no embarazo		
	Basal (n=20)	6 meses (n=20)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.0 % (0)	0.0 % (0)
<i>P. gingivalis</i>	10 % (2)	5 % (1)
<i>P. intermedia</i>	30 % (6)	40 % (8)
<i>T. forsythia</i>	5 % (1)	0.0 % (0)
<i>P. micra</i>	30 % (6)	30 % (6)
<i>C. rectus</i>	10 % (2)	20 % (4)
<i>F. nucleatum</i>	95 % (19)	85 % (17)

Tabla 33. Frecuencia de detección de patógenos periodontales (porcentaje / número absoluto respecto al total de pacientes) en el grupo embarazo y grupo no embarazo. \* =  $p < 0.05$ , comparaciones intragrupo.

### Proporción de patógenos periodontales

En el biofilm subgingival se detectaron diferencias cualitativas entre el grupo embarazo y el grupo no embarazo, con tendencia a presentar mayor proporción generalizada de patógenos periodontales en las pacientes gestantes (tabla 34). En la comparación uno, las proporciones de *P.intermedia/nigrescens* fueron significativamente mayores para el grupo embarazo. En la comparación dos, los patógenos cuyas proporciones aparecieron de forma significativa elevadas fueron *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

	Comparación 1		Comparación 2	
	Trimestre 1	Basal	Trimestre 3	6 meses

<i>Aa</i>	0.30 (1.47)	0.0 (0.0)	1.22 (4.26)*	0.0 (0.0)
<i>P. gingivalis</i>	5.69 (12.17)	2.20 (9.36)	8.12 (17.19)*	0.11 (0.50)
<i>P. intermedia</i>	2.37 (5.13)*	0.74 ( 1.97)	2.55 (9.91)	0.71 (2.34)
<i>T. forsythia</i>	0.46 (2.16)	0.0 (0.0)	0.41 (1.66)	0.0 (0.0)
<i>P. micra</i>	2.66 (7.47)	0.55 (1.14)	2.06 (4.82)	0.61 (1.50)
<i>C. rectus</i>	0.07 (0.29)	0.56 (0.17)	0.13 (0.62)	0.30 (0.85)
<i>F. nucleatum</i>	5.38 (7.52)	7.12 (7.69)	5.38 (7.09)	3.69 (3.47)

Tabla 34. Comparación intergrupo de las proporciones de patógenos periodontales entre grupo embarazo y grupo control. \* =p<0.05.

### ***Comparación visita post-parto con el grupo no embarazo***

A los tres meses tras el parto, el grupo gestante no presentó diferencias significativas en ninguna de las variables microbiológicas evaluadas en comparación con el grupo no embarazo.

## **ESTUDIO III**

### **Índices clínicos localización-específicos**

Para profundizar en el análisis de las variables inmunológicas (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en FCG se realizó un análisis específico de los índices de placa y gingival de las localizaciones a partir de las cuales se obtuvo la muestra (sPII, sGI).

El índice de placa localizado (sPII) se mostró con tendencia a disminuir durante el embarazo e incrementar tras el parto, aunque los cambios no fueron significativos. El índice gingival localizado (sGI) incrementó significativamente del primer al segundo trimestre (p=0.02), mantuvo niveles elevados en el tercer trimestre y disminuyó tras el parto (p<0.001)(tabla 35).

	Grupo embarazo			
	1 <sup>er</sup> trimestre (n=42)	2 <sup>o</sup> trimestre (n=42)	3 <sup>er</sup> trimestre (n=42)	Postparto (n=26)
sPII	0.50	0.00	0.00	0.50

	(0.0-1.0)	(0.0-0.50)	(0.0-0.50)	(0.0-0.50)
sGI	0.75	1.00*	1.00	0.25*
	(0.00-1.50)	(0.50-2.00)	(0.50-2.00)	(0.00-1.00)
Non-pregnant group				
		Baseline		6 months
		(n=20)		(n=20)
sPII		0.00		0.00
		(0.00-0.50)		(0.00-0.50)
s-GI		0.25		0.50
		(0.00-1.00)		(0.00-1.00)

*Tabla 35.* Índices localización-específicos de placa (sPII) y gingival (sGI) [media (rango intercuartil)] de las localizaciones en las que se tomó la muestra de FCG en el grupo embarazo y no embarazo. Comparación intragrupo. Test de Friedman con corrección de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ .

### ***Comparación del grupo embarazo con no embarazo***

El grupo no embarazo no presentó diferencias significativas en sPII ni sGI entre las dos visitas. Al comparar con el grupo embarazo, se obtuvieron diferencias significativas en sGI entre el tercer trimestre (grupo embarazo) y visita 6-meses del grupo no embarazo.

## **Variables inmunológicas**

### **Interleukina-6 (IL-6)**

La tabla 36 muestra los cambios en FCG de IL-6 a lo largo del embarazo y postparto. Tanto la cantidad como la concentración de este mediador sufrió un incremento progresivo a lo largo del embarazo y disminuyó tras el parto, de forma concomitante al IG localización-específico. Los cambios fueron significativos para la reducción observada tras el parto ( $p < 0.001$ ).

### ***Comparación del grupo embarazo con no embarazo***

El grupo no embarazo no presentó diferencias significativas en IL-6 (cantidad y concentración) entre las dos visitas. No hubo diferencias significativas en IL-6 (cantidad y concentración) entre el grupo embarazo y el grupo control (Tabla 36).

	Pregnant group			
	First trimester	Second trimester	Third trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Amount (pg)	0.08 (0.01-0.14)	0.12 (0.02-0.20)	0.16 (0.03-0.27)	0.04* (0.0-0.22)
Concentration (ng/ml)	0.24 (0.02-0.62)	0.27 (0.06-0.81)	0.66 (0.16-1.02)	0.11* (0.0-0.56)
	Grupo no embarazo			
	Basal			6 meses
	(n=20)			(n=20)
Amount (pg)	0.01 (0.0-0.12)			0.06 (0.0-0.22)
Concentration (ng/ml)	0.05 (0.0-0.3)			0.26 (0.0-1.39)

Tabla 36. Niveles de IL-6 (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival. Comparación inter-grupo. Test U de Mann Whitney. \*p<0.05

### TNF- $\alpha$

La tabla 37 muestra la evolución de TNF- $\alpha$  en FCG durante el embarazo. Este mediador sufrió un descenso progresivo a lo largo del embarazo (cantidad y concentración) e incrementó postparto. Los cambios fueron significativos para la reducción del segundo al tercer trimestre en cantidad absoluta (p=0.03).

	Pregnant group			
	First trimester	Second trimester	Third trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Amount (pg)	3.99 (1.70-9.33)	2.37 (1.07-11.44)	1.30* (0.35-9.69)	1.31 (0.84-7.31)
Concentration (ng/ml)	9.07 (5.77-30.68)	8.84 (4.01-48.10)	4.84 (0.99-24.25)	9.56 (1.75-26.98)

	Non-pregnant group	
	Baseline (n=20)	6 months (n=20)
Amount (pg)	0.45 (0.09-0.59)	0.40 (0.09-0.82)
Concentration (ng/ml)	1.55 (0.21-2.94)	1.86 (0.74-2.92)

Tabla 37. Niveles de TNF- $\alpha$  (cantidad y concentración) en fluido crevicular gingival. Comparación inter-grupo. Test U de Mann Whitney. \*p<0.05

#### *Comparación del grupo embarazo con no embarazo*

TNF- $\alpha$  mostró diferencias significativas entre el primer trimestre del embarazo y la primera visita del grupo no embarazo.

## **ANÁLISIS MULTIVARIANTE. ANÁLISIS CHAID-EXHAUSTIVO**

Se construyó un árbol de clasificación para cada trimestre, analizando el impacto de las 29 variables independientes evaluadas sobre la inflamación gingival (GI)

### **Primer trimestre**

El índice de placa fue el único factor significativamente involucrado con la inflamación gingival del primer trimestre del embarazo. Cuando el índice de placa fue  $\leq 0.35$ , el índice gingival esperado en el trimestre fue 0.49 (nodo 1). En el segundo nodo, donde el PII incrementó (0.35-0.51), el índice gingival incrementó a 0.79. El mismo patrón fue observado en el tercer y cuarto nodo, de forma que según incrementó progresivamente el índice de placa, así lo hizo el índice gingival (1.14 y 1.56 respectivamente).



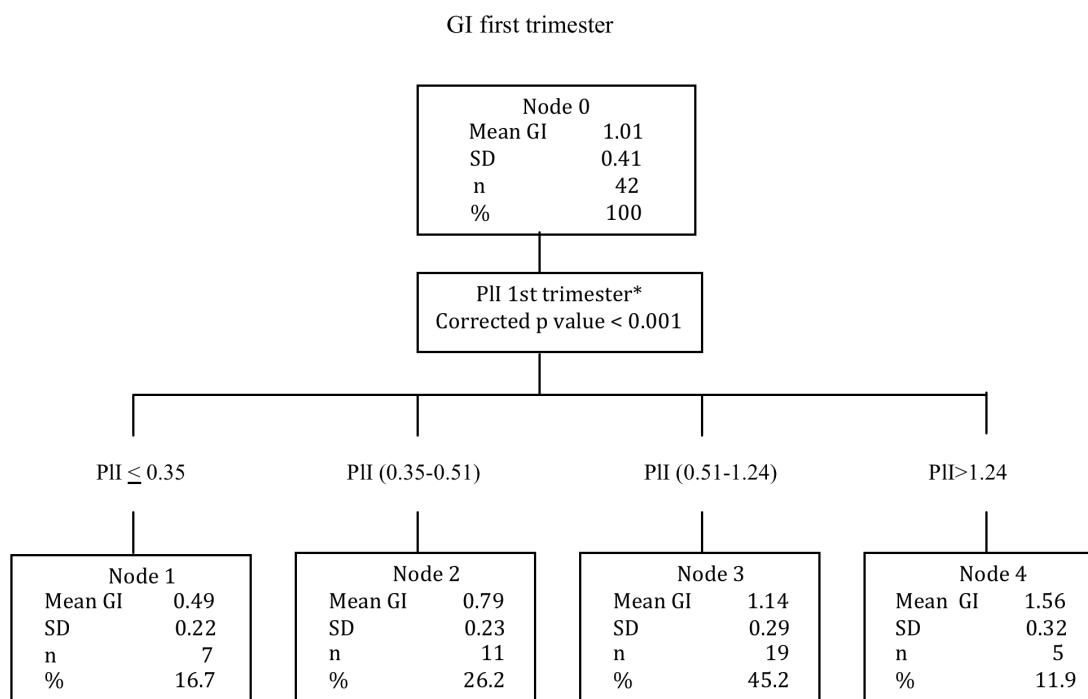


Tabla 38. Análisis CHAID exhaustivo del primer trimestre. GI (Índice gingival); PII (Índice de placa); SD (Desviación estándar). \* $p < 0.05$ .

## Segundo trimestre

El índice de placa fue la principal variable involucrada en la inflamación gingival durante el segundo trimestre. Se obtuvieron tres nodos filiales dependiendo la puntuación de PII del segundo trimestre ( $p < 0.001$ ), con GI de 0.72, 1.23 y 1.85 para los nodos 1, 2 y 3 respectivamente.

El nodo 2 fue el más prevalente, incluyendo el 61.9% de los casos, y estuvo significativamente asociado con los recuentos de *P.gingivalis*. Cuando los recuentos de *Pg* fueron  $< 6600$  colonias se asoció con un GI de 1.09, mientras que cuando los recuentos de *Pg* excedieron las 660 colonias, el IG incrementó a 1.48 (Tabla 39).

## Tercer trimestre

Las variables del tercer trimestre siguieron el mismo patrón al obtenido para el segundo trimestre. El índice de placa fue la variable principal involucrada en el índice gingival ( $p < 0.001$ ). Se obtuvieron tres nodos filiales, con diferentes grados de severidad de GI dependiendo de los valores del índice de placa. El nodo 2 fue de nuevo el más prevalente con un GI de 1.22, y se asoció significativamente con los recuentos de *P.gingivalis*. La ausencia de *Pg* se asoció con valores de inflamación menores, mientras que su presencia se asoció al incremento del GI (Tabla 40).

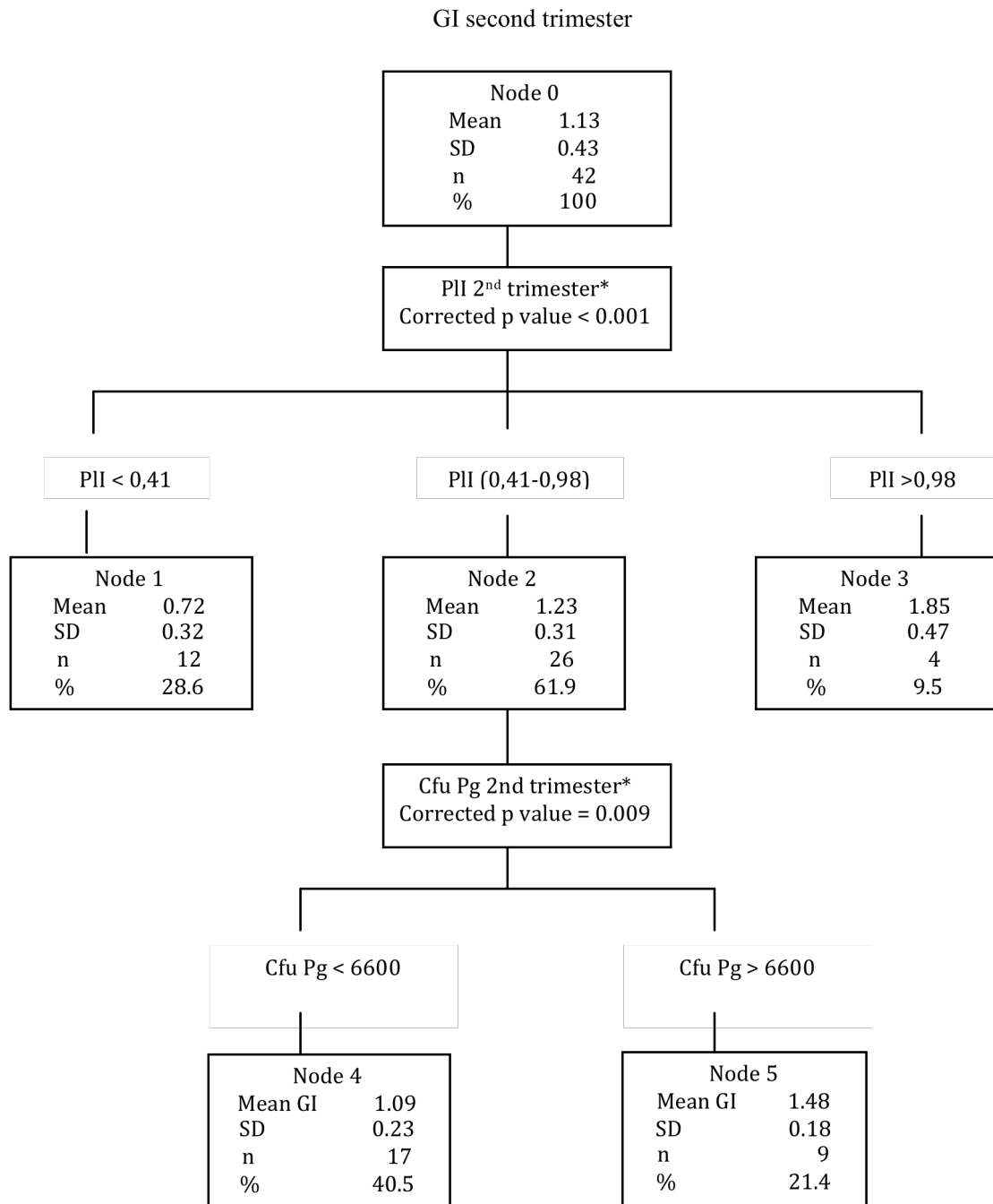


Tabla 39. Análisis CHAID exhaustivo del segundo trimestre. GI (Índice gingival); PII (Índice de placa); Cfu Pg (Unidades formadoras de colonias de *Porphyromonas gingivalis*); SD (Desviación estándar). \*p<0.05.

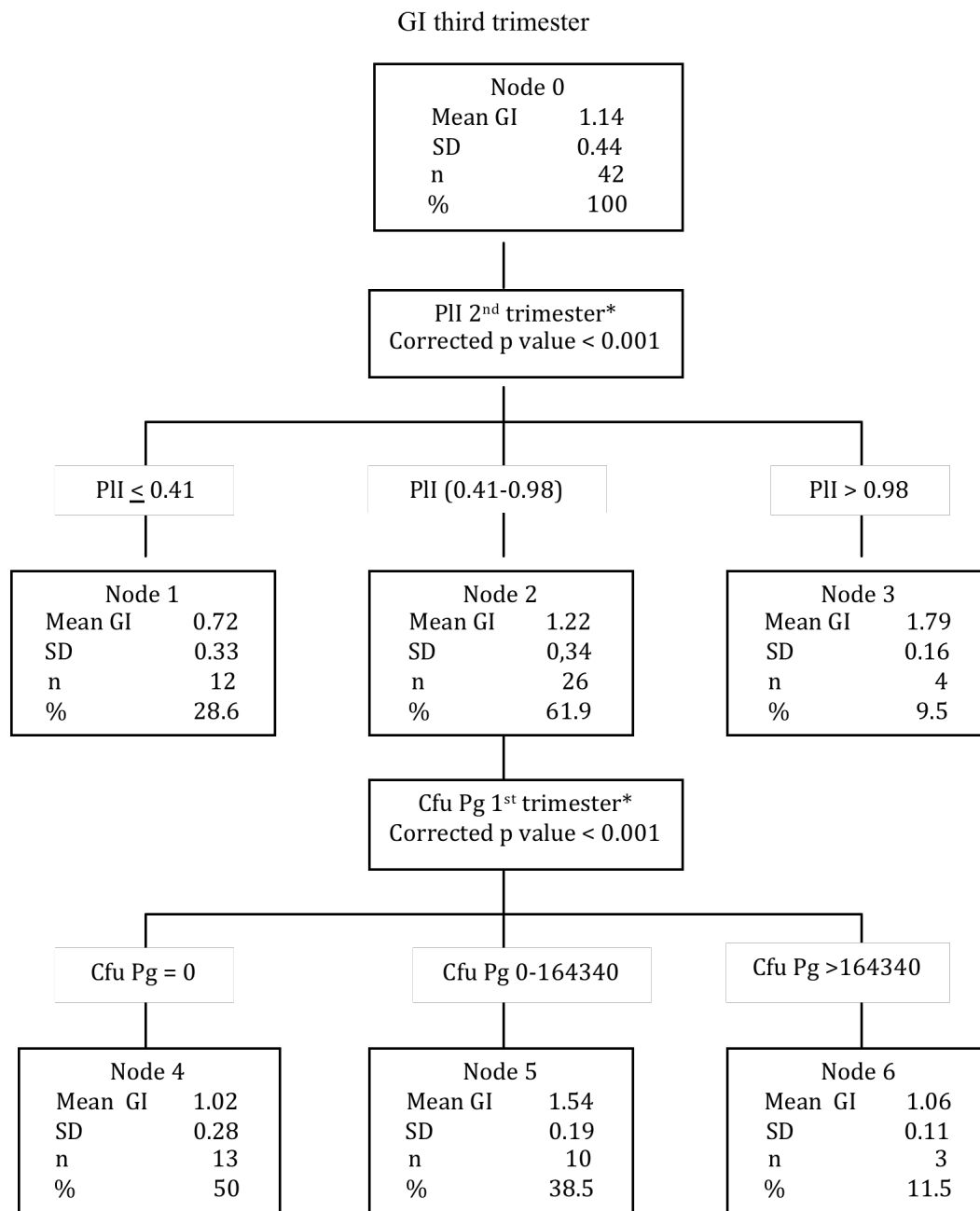


Tabla 40. Análisis CHAID exhaustivo del tercer trimestre. GI (Índice gingival); PII (Índice de placa); Cfu Pg (Unidades formadoras de colonias de *Porphyromonas gingivalis*); SD (Desviación estándar). \*p<0.05.

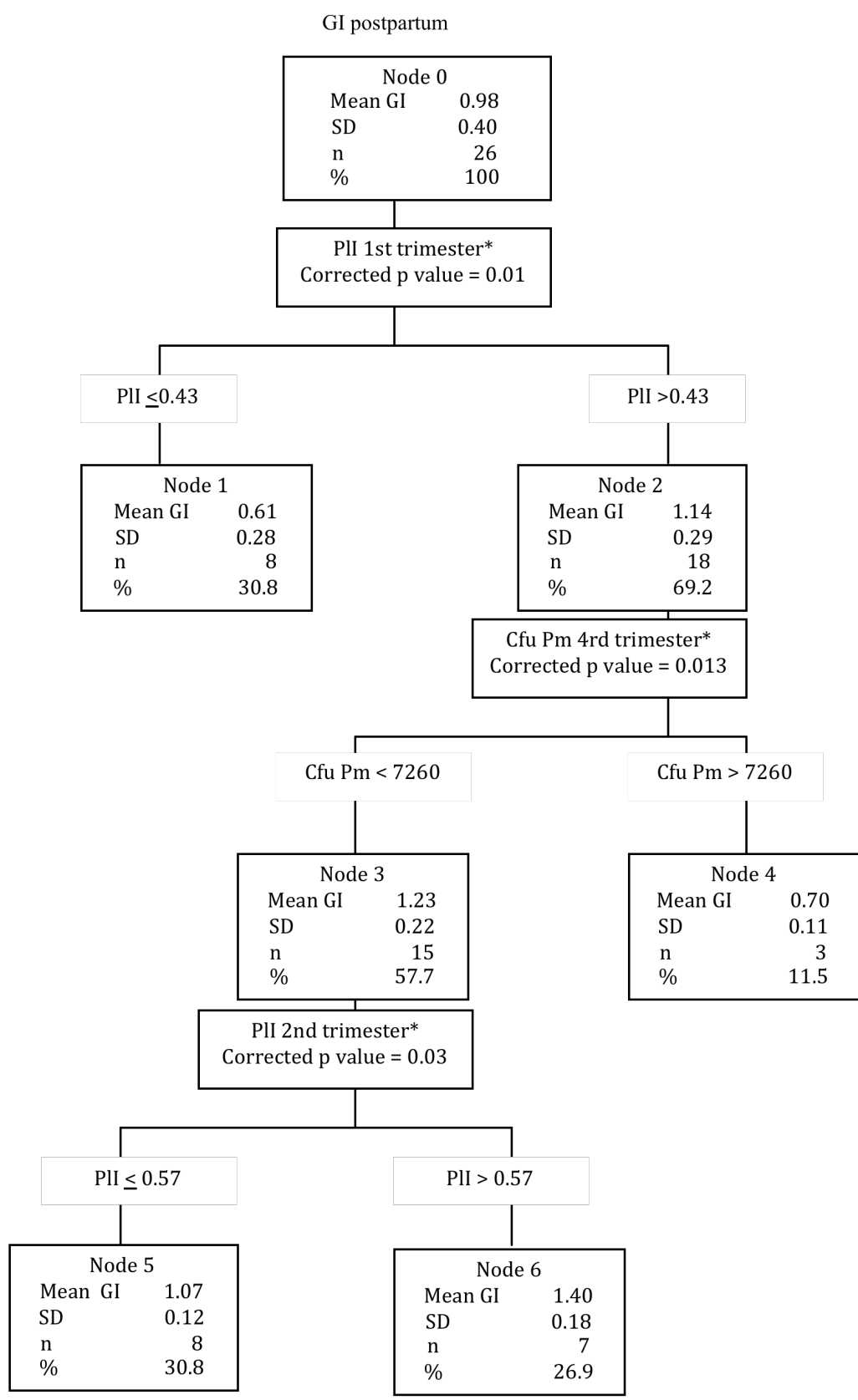


Tabla 41. Análisis CHAID exhaustivo post-parto. GI (Índice gingival); PII (Índice de placa); Cfu Pm (Unidades formadoras de colonias de *Parvimonas micra*); SD (Desviación estándar). \*p<0.05.

## Postparto

El índice de placa presente al comienzo del embarazo fue la principal variable responsable del índice gingival observado tras el parto. Cuando las mujeres embarazadas presentaron un  $PII < 0.43$  en el primer trimestre, el GI esperado tras el parto fue de 0.61 (nodo 1). Por el contrario, las mujeres que en el primer trimestre presentaron el  $PII > 0.43$ , el GI incrementó a 1.14 tras el parto (nodo 2). La inflamación gingival también dependió de los recuentos de *P.micra* y de PII del segundo trimestre.

# DISCUSIÓN

El presente estudio de cohortes longitudinal ha sido diseñado con objeto de evaluar la posible exacerbabción en la inflamación gingival observada durante el embarazo, así como para analizar de forma simultánea el impacto que ejercen diferentes factores etiológicos potenciales sobre el posible incremento en la inflamación gingival.

Los resultados clínicos confirman un incremento significativo en la inflamación gingival durante el segundo trimestre del embarazo, el cual se mantuvo en el tercer trimestre y disminuyó tras el parto. Para analizar el impacto que ejercieron los factores clínicos, socio-demográficos, inmunológicos y microbiológicos evaluados sobre la inflamación gingival, se aplicó un análisis multivariante (exhaustive CHAID analysis). Como resultado de este análisis, se observó que el principal factor etiológico implicado en la inflamación gingival durante el embarazo fue la placa dental. Asimismo, durante el segundo y tercer trimestres del embarazo, las pacientes que presentaron el patógeno *P.gingivalis* en su biofilm subgingival significativamente presentaron empeoramiento de su estatus clínico respecto a las pacientes Pg-negativas. Por consiguiente, la agresión bacteriana a los tejidos gingivales, tanto de forma cuantitativa (depósitos de placa bacteriana) como cualitativa (presencia de *P.gingivalis*) parece afectar a la inflamación gingival observada durante el embarazo.

## **8.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

La prevalencia, extensión y severidad de la gingivitis del embarazo son datos que varían ampliamente entre los diferentes estudios publicados. La gran heterogeneidad metodológica explica, al menos en parte, las diferencias existentes en la diversidad de resultados observados.

Para evaluar la exposición de los tejidos gingivales a los cambios del embarazo se optó por un diseño de estudio de cohortes prospectivo (Cohen et al., 1969, Hugoson, 1971, Chaikin, 1977, O'Neil, 1979b, Machuca et al., 1999, Tilakaratne et al., 2000, Yalcin et al., 2002b, Gursoy et al., 2008), dado que dentro de los estudios observacionales, permiten mejorar el control de los factores de confusión en comparación con los estudios transversales (Loe and Silness, 1963, Silness and Loe, 1964, Katz et al., 1969, Arafat, 1974, Adams et al., 1974, Samant et al., 1976, Conde Vidal et al., 1981, Zaki et al., 1984, Jonsson et al., 1988, Miyazaki et al., 1991, Muramatsu and Takaesu, 1994, Kraivaphan et al., 2007, Kraivaphan et al., 2006, Acharya and Bhat, 2009).

Otros factores que varían entre las publicaciones y que pueden haber afectado al amplio rango obtenido en los resultados incluyen la utilización de diferentes índices de medida, diseño del estudio, equipos de medición empleados, tipo de población evaluada y control de factores de confusión. Para evaluar la inflamación del tejido gingival durante el embarazo, el presente estudio fue diseñado con objeto de estandarizar la metodología empleada, tratando de solventar las limitaciones previamente

contempladas. Para ello, los resultados obtenidos siguen las recomendaciones STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies), diseñadas para mejorar la calidad de la publicación de estudios observacionales (von Elm et al., 2008).

El seguimiento longitudinal del estudio se diseñó en base a estudios previos que han evaluado el efecto del embarazo sobre el periodonto, tomando registros durante los tres trimestres del embarazo y a los 3 meses postparto (Cohen et al., 1969, Cohen et al., 1971, Tilakaratne et al., 2000, Yalcin et al., 2002b, Gursoy et al., 2008). Para la homogenización de la muestra, se seleccionó un grupo de mujeres embarazadas sin presencia o historia previa de periodontitis (Kornman and Loesche, 1980, Raber-Durlacher et al., 1994, Gursoy et al., 2008, Akalin et al., 2009). Uno de los sesgos principales de otros estudios publicados al respecto es la inclusión combinada de pacientes con gingivitis y periodontitis, lo cual supone un importante factor de confusión para el análisis de la inflamación gingival (Cohen et al., 1969, Cohen et al., 1971, Hugoson, 1971, Arafat, 1974, Jonsson et al., 1988, Miyazaki et al., 1991). También se da el caso de estudios en los que la condición periodontal de las pacientes gestantes no se encuentra especificado (Katz et al., 1969, Acharya and Bhat, 2009, Adams et al., 1974, Samant et al., 1976, Cerna et al., 1990, el-Ashiry et al., 1971, Hugoson, 1971, Jensen et al., 1981, Kraivaphan et al., 2007, O'Neil, 1979b, Taani et al., 2003, Yalcin et al., 2002b).

Para tratar de explicar la exacerbación en la inflamación gingival durante el embarazo se han propuesto diferentes teorías, pero los resultados no son concluyentes. Dentro de las teorías con mayor peso se incluyen cambios en biofilm subgingival, modificaciones en el sistema inmunológico para la tolerancia fetal, cambios en la vascularización y cambios en células específicas del periodonto. Estudios previos han analizado las diferentes posibilidades etiológicas, pero generalmente de forma individual. Sin embargo, la respuesta del periodonto probablemente no se deba a un solo mecanismo, sino que sea de naturaleza multifactorial (Mariotti, 1994). Por este motivo, la evaluación simultánea de las diferentes posturas etiológicas permiten una mejor comprensión de esta endocrinopatía. Dentro de los factores más relevantes del presente estudio, destaca la evaluación simultánea de variables clínicas, socio-demográficas, inmunológicas y microbiológicas.

## **8.2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Dentro de las limitaciones del estudio, es importante destacar la elevada pérdida de pacientes, especialmente en la visita postparto. En el caso de las variables microbiológicas, el tamaño muestral residual fue suficientemente potente para detectar diferencias significativas para todos los patógenos en la comparativa del tercer trimestre con la visita con postparto. Para las variables inmunológicas, se calcularon las diferencias mínimas detectables necesarias en función del tamaño muestral, con el



objetivo de evaluar si la ausencia de diferencias significativas se debió a una muestra insuficiente para su detección.

Otra limitación destacable de este estudio fue la falta de homogeneidad entre el grupo embarazo y el grupo no embarazo en relación a las características sociodemográficas y situación clínica inicial, lo cual dificulta la comparación entre grupos. El grupo embarazo presentó significativamente mayor edad y menor nivel educacional. Tal y como se ha descrito previamente, el estatus oral durante el embarazo está relacionado con el nivel educacional, estatus profesional y atención dental previa (Machuca et al., 1999, Yalcin et al., 2002b, Taani et al., 2003, Sarlati et al., 2004). En relación a la edad, se ha observado que los sujetos con mayor edad son más propensos a desarrollar gingivitis en respuesta a la formación de placa (Fransson et al., 1999, Kamma et al., 2009, Tsalikis et al., 2002). Sin embargo, hay que destacar que todos los sujetos incluidos en este estudio cumplieron con los criterios de inclusión/exclusión.

### **8.3. VARIABLES CLÍNICAS**

Las variables clínicas seleccionadas en este estudio son el índice gingival (GI) (Loe and Silness, 1963) y el índice de placa (PII)(Silness and Loe, 1964). La elección de los citados índices se debe a que son los más empleados en la literatura para analizar la gingivitis desarrollada durante el embarazo, lo cual favorece la comparación e interpretación de resultados (Katz et al., 1969, Hugoson, 1971, Adams et al., 1974, O'Neil, 1979b, Kornman and Loesche, 1980, Zaki et al., 1984, Tilakaratne et al., 2000, Yalcin et al., 2002a, Taani et al., 2003).

#### **Índice gingival**

La exacerbación en la inflamación gingival puede darse tanto en el segundo trimestre (Arafat, 1974, Gursoy et al., 2008, Samant et al., 1976, Muramatsu and Takaesu, 1994) como en el tercer trimestre (Loe and Silness, 1963, Cohen et al., 1971, Hugoson, 1971, Kornman and Loesche, 1980, Zaki et al., 1984, Tilakaratne et al., 2000, Yalcin et al., 2002b, Taani et al., 2003). Tras el parto, los índices gingivales tienden a normalizarse. En el estudio actual se corrobora el incremento de la inflamación gingival durante el embarazo, siendo significativo el incremento observado en el segundo trimestre. Respecto a la distribución intraoral de la inflamación gingival, a pesar de que los sectores posteriores presentaron mayor inflamación, el incremento fue solo significativo para el sector anterior. Este hallazgo está en concordancia con estudios previos que concluyen que los sectores anteriores son los que proporcionalmente presentan mayor cambio inflamatorio (Loe and Silness, 1963, Raber-Durlacher et al., 1994).

## Índice de placa

En relación al nivel de placa de las pacientes gestantes, durante el embarazo no se observaron cambios significativos en este parámetro. Estos resultados están en concordancia el resto de publicaciones que demuestran que la gingivitis gravídica tiene lugar sin cambios asociados en los niveles de placa (Löe & Silness 1963, Silness & Löe 1964, Cohen 1969, Hugoson 1971, Arafat 1974, Samant 1976, O'Neil 1979, Zaki et al. 1984, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002, Taani et al. 2003, Gürsoy et al. 2008). A pesar de no existir diferencias significativas, al analizar los resultados se observa que existe un tendencia a la disminución del índice de placa durante el embarazo en relación a la visita del primer trimestre. O'Neil (1979) y Gürsoy et. al (2008) corroboran estos hallazgos y lo atribuyen a las instrucciones de higiene oral facilitadas a las gestantes en el primer trimestre. Sin embargo, otros autores no detectaron esta tendencia (Silness & Löe 1964, Cohen et al. 1969, Hugoson et al. 1970), por lo que el leve descenso en el índice de placa puede deberse bien al efecto Hawthorne o bien el incremento en el vómito en el primer trimestre, dificultando el control de placa. Taani et al. (2003) encuentran asociación significativa entre las náuseas y el incremento en la inflamación gingival, asociado a un peor cepillado.

Para evaluar el sesgo que el índice de placa pudiera inducir sobre el índice gingival, se analizó la reactividad a la placa, a través del cociente existente entre el índice gingival y el índice de placa (G/P). Este análisis constató un incremento de la reactividad gingival durante el embarazo en comparación con postparto, así como la diferenciación de dos grupos a partir de los valores obtenidos (grupo alta reactividad y grupo baja reactividad), lo cual está en concordancia con estudios previos (Kinnby et al., 1996, Trombelli et al., 2006).

## 8.4. VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

Uno de los objetivos del presente estudio longitudinal fue valorar si el embarazo induce cambios en el biofilm subgingival que se asocien al incremento de la gingivitis observada durante la gestación. En esta investigación, no se observaron cambios en el perfil microbiológico del biofilm subgingival durante el embarazo. Sin embargo, se constataron diferencias significativas para todos los patógenos tras el parto, lo cual implica que durante el embarazo se produjo un cambio cualitativo en la flora, de carácter transitorio debido a la modificación que sufre tras el parto. El empeoramiento de los parámetros clínicos fue asociado con la presencia de *P. gingivalis* y *P. intermedia*, que a su vez se correlacionaron positivamente con los niveles hormonales en saliva.

### *Recuentos bacterianos totales*

Para evaluar los posibles cambios microbiológicos durante embarazo, el primer paso fue descartar un posible incremento cuantitativo de la flora total. Tras analizar los recuentos bacterianos de forma longitudinal, se constató que no se desarrollaron cambios en este parámetro durante el embarazo. Se descarta, por tanto, que cambios cuantitativos del biofilm subgingival sean responsables de la exacerbación de la inflamación gingival. Este hallazgo se corrobora con lo anteriormente publicado por otros autores (Kornman and Loesche, 1980, Jonsson et al., 1988, Yokoyama et al., 2008, Adriaens et al., 2009).

### ***Frecuencia de detección de patógenos***

La frecuencia de detección de patógenos periodontales se mantuvo estable a lo largo del embarazo. En la visita realizada a los tres meses postparto se observó un descenso generalizado de la prevalencia de los patógenos periodontales, aunque esta tendencia solamente fue significativa para *A. actinomycetemcomitans*.

El rango de prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue de 16.4-20.5%. La prevalencia del patógeno durante el embarazo fue superior a la obtenida en una muestra de pacientes con gingivitis en España (Lau et al., 2004). No pueden establecerse comparaciones con estudios sobre la microbiología del embarazo mediante cultivo debido a que este patógeno no se incluye en los análisis (Kornman and Loesche, 1980, Jensen et al., 1981, Jonsson et al., 1988, Muramatsu and Takaesu, 1994, Raber-Durlacher et al., 1994). Empleando tecnología DNA-DNA checkerboard, Adriaens et al. (2009) obtuvieron un 25% de localizaciones positivas para *A. actinomycetemcomitans*. En la comparación con el grupo control, *A. actinomycetemcomitans* mostró diferencias con el grupo control dado que este patógeno no fue detectado en el grupo no embarazo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el grupo no embarazo presentó diferencias significativas en los índices de placa y gingival, con valores inferiores desde el comienzo.

*P. gingivalis* se detectó en el 40% de las mujeres embarazadas, lo cual fue similar a los hallazgos de una población española con gingivitis (Lau et al. 2004). En comparación con el grupo de investigación suiza, Adriaens et al. (2009) obtuvo una prevalencia inferior (20%) al emplear DNA-DNA checkerboard.

### ***Proporción de patógenos***

Durante el embarazo no se obtuvieron diferencias significativas de ninguno de los patógenos periodontales evaluados. Sin embargo, las diferencias se constataron con el cambio de embarazo a postparto, dado que se observó una reducción generalizada de la carga patogénica. En este sentido,

los resultados microbiológicos corroboran los resultados clínicos, al asociarse el incremento de la inflamación gingival con un biofilm subgingival de mayor virulencia. Tras el parto, la microflora experimentó un drástico cambio cualitativo, dado que la frecuencia de detección y recuentos de patógenos se redujeron de forma significativa. Estos hallazgos corroboran resultados previamente publicados (Kornman & Loesche 1982, Raber-Durlacher et al. 1994). Los hallazgos microbiológicos postparto coinciden con el descenso en la inflamación gingival, a pesar del incremento en el índice de placa observado. Mediante tecnología DNA-DNA checkerboard se ha descrito la reducción significativa de 8 de las 37 especies analizadas (*Eubacterium saburreum*, *F. Nucleatum naviforme*, *F. Nucleatum polymorphum*, *Leptotrichia buccalis*, *P. micra*, *Selenomonas noxia*, *Staphylococcus aureus* y *St. Mutans*) (Adriaens et al. 2009).

A pesar del descenso generalizado de que experimentaron al matoría de patógenos tras el parto, especies como *P.intermedia* y *P.micra* sufrieron sobrecrecimiento postparto. Gürsoy et al. (2009) corroboran nuestros hallazgos, dado que también obtuvieron un incremento significativo de *P.intermedia* a las 4-6 semanas postparto. Muramatsu & Takaesu (1994) también obtuvieron diferencias significativas para el sobrecrecimiento de *P.intermedia*. Otros estudios recientes han descrito la presencia de elevados recuentos bacterianos de *Actinomyces neuui*, *Bifidobacterium bifidum*, *Corynebacterium pseudogenitalis*, *Porphyromas endodontalis*, *Porphyromonas bivia* y *Pseudomonas aeruginosa* en mujeres postparto de más de 6 meses, sugiriendo que la gingivitis es común durante un período de tiempo elevado tras el parto (Persson et al., 2008, Persson et al., 2009).

Con el objetivo de evitar la infraestimación del verdadero impacto de la presencia de patógenos, especialmente aquellos con baja frecuencia de detección, se analizaron las proporciones de patógenos en las muestras positivas en función de las diferentes especies (Herrera et al., 2008). Todos los patógenos presentaron la mayor frecuencia de detección y recuentos en el segundo trimestre, a excepción de *P.gingivalis* y *T.forsythia*, las cuales destacaron en el tercer trimestre. Este patrón de comportamiento, significativo para *A. actinomycetemcomitans* y *P.micra*, coincide con los estudios previamente publicados (Kornman and Loesche, 1980, Gürsoy et al., 2009, Adriaens et al., 2009). El comportamiento mostrado por *P.gingivalis* en las muestras positivas respondió a un incremento progresivo durante el embarazo, con un pico máximo en el tercer trimestre, y un abrupto descenso tras el parto. Este incremento de *P.gingivalis* es biológicamente plausible gracias a la capacidad de esta especie de utilizar progesterona como factor de crecimiento (Kornman & Loesche 1982). Para la comparación de este patógeno, es importante tener en cuenta que en los estudio clásicos aparece agrupado con *P.intermedia* bajo la denominación de bacteroides negropigmentados (Jensen et al., 1981), lo cual imposibilita conocer las proporciones reales del patógeno previa a la reclasificación taxonómica (Shah and Collins, 1990). De hecho, no existen estudios previos que describan incremento de *P.gingivalis* sin agrupar.

En relación a *P. intermedia*, aunque no se observaron cambios significativos sí se detectó tendencia al incremento durante el embarazo. En el estudio clásico de Kornman & Loesche (1980), describieron un incremento significativo en el porcentaje y recuentos totales de *P.intermedia* solamente durante el segundo trimestre, con reducción durante el tercer trimestre y postparto. A este respecto, Mariotti (1994) apunta que si el crecimiento bacteriano dependiese exclusivamente de las hormonas sexuales, los niveles de *P. intermedia* deberían incrementar de forma progresiva hasta el tercer trimestre. Jensen et al. (1981) obtuvo un sobrecrecimiento 55x en mujeres gestantes y 16x en mujeres con tratamiento anticonceptivo, aunque el análisis microbiológico se limitó a la valoración de negropigmentados y fusobacterias en un estudio transversal. Raber-Durlacher et al. (1994) realizó un modelo de gingivitis experimental durante el embarazo, procedimiento que a su vez fue repetido tras el parto sobre las mismas pacientes. Durante el embarazo, tras un exhaustivo control de placa se indujo gingivitis experimental tras retirar todo tipo de control de higiene oral durante 14 días a partir de la semana 25 de gestación. Los niveles de *P.intermedia* observados incrementaron del 1.1% hasta el 10% en el día 14. Sin embargo, en el procedimiento postparto no se observó tal incremento de *P.intermedia*. En este estudio *P.gingivalis* no fue detectada en ningún caso, aunque no hay que olvidar que la acumulación de placa durante 14 días tras un período de intenso control de placa no sea periodo de tiempo suficiente para la colonización por *P. gingivalis*. Muramatsu & Takaesu (1994) también encontraron incremento significativo de *P.intermedia* durante el segundo trimestre del embarazo, determinado mediante un estudio transversal.

En un estudio transversal llevado a cabo por Jonsson et al. (1988), no se encontraron diferencias significativas en los recuentos y porcentajes de *P.intermedia* en el grupo de mujeres embarazadas ni en el grupo de mujeres no embarazadas. Sin embargo, las muestras microbiológicas fueron tomadas solamente en siete pacientes durante el segundo y tercer trimestres del embarazo. Adriaens et al. (2009) observó una disminución significativa de *P.intermedia* desde la semana 12 hasta la semana 36 mediante análisis de Wilcoxon, descartando el sobrecrecimiento del patógeno. Gürsoy et al. (2009) observó un incremento transitorio de *P.intermedia sensu lato* durante el segundo trimestre, aunque las diferencias tampoco fueron significativas. Por otro lado, este grupo corrobora nuestros hallazgos de un sobrecrecimiento del patógeno postparto.

En relación a otras etapas de la vida en la cual existe influencia de las hormonas sexuales esteroideas, los resultados también son contradictorios. Klinger et al. (1998) observó un incremento de *P.intermedia* con el uso de anticonceptivos, mientras que otros autores lo han observado en la etapa puberal (Nakagawa et al., 1994, van Oosten et al., 1988) (Nakagawa et al. 1994). Van Oosten et al. (1998) obtuvieron incremento de bacteroides negropigmentados y espiroquetas en niños en la etapa pre-puberal. Sin embargo, otros autores no encontraron tales diferencias (Gusberti et al., 1990).

## VARIABLES INMUNOLÓGICAS

Para el análisis inmunológico de los marcadores de la inflamación, la toma de muestras de fluido crevicular gingival (FCG) se realizó en el sector anterosuperior (localización mesial de ambos caninos superiores), dado que el sextante anterosuperior es el que proporcionalmente ha demostrado presentar mayores cambios inflamatorios durante el embarazo (Silness and Loe, 1964, Raber-Durlacher et al., 1994). En relación a la superficie, las localizaciones interproximales son las que presentan mayor inflamación, seguido de lingual y vestibular respectivamente (Loe and Silness, 1963, Hugoson, 1971), motivo por el cual se seleccionaron localizaciones mesiales.

Las hormonas sexuales esteroideas son factores cruciales en la modulación de la respuesta inmunitaria materna durante el embarazo (Szekeres-Bartho, 2002, Shiau and Reynolds, Mellor and Munn, 2000). La tolerancia inmunológica durante el embarazo parece estar asociada a un incremento de la respuesta inmunitaria humoral (producción de citokinas tipo-2) y a una disminución de la respuesta mediada por células (producción de citokinas tipo-1).

### Interleukina-1

La IL-1 es una potente citoquina pro-inflamatoria, la cual destaca por su papel en la inflamación periodontal aguda y crónica (Silva et al., 2008, Polak et al., 2009, Ren et al., 2009, Vernal et al., 2009). En nuestro estudio, el grupo embarazo presentó niveles más elevados de IL-1b en FCG en comparación con el grupo de mujeres en fase lútea del grupo no embarazo.

Por el contrario, estudios previos han obtenido una reducción en la síntesis de IL-1 $\beta$  por monocitos aislados de mujeres embarazadas en el tercer trimestre (7UI/ml) en comparación con el grupo de mujeres no embarazadas en fase lútea (52.4 UI/ml) (Polan et al., 1990). Morishita et al. (1999) corrobora estos hallazgos en un estudio *in vitro* en el cual la incubación de linfocitos periféricos con progesterona/estradiol y lipopolisacáridos bacterianos redujo la producción de IL-1 $\beta$ .

En nuestro estudio no se obtuvo correlación positiva entre el incremento en la inflamación gingival y los niveles de IL-1 $\beta$ , lo cual está en concordancia con estudios previos (Gonzales et al., 2001, Yucel et al., 2008, Bergmann and Deinzer, 2008), mientras que está en desacuerdo con otros autores (Kinane et al., 1992, Heasman et al., 1993). La posible influencia de factores genéticos no se ha contemplado en este estudio, por lo que su potencial en los resultados obtenidos no debe ser excluido (Lang et al., 2000, Scapoli et al., 2005).

### Interleukina-6

Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que las hormonas sexuales ejercen un efecto inhibitorio sobre la IL-6 (Lapp et al., 1995, Gornstein et al., 1999, Lapp and Lapp, 2005, Cohen-Solal et al., 1993). Telleria et al. (1998) corrobora este hallazgo en un estudio de experimentación animal, aunque la expresión de IL-6 RNAm incrementó tras inyectar lipopolisacárido bacteriano. Sin embargo, existe controversia al respecto. Otros estudios muestran que la producción de IL-6 incrementa tras la estimulación con progesterona o estradiol a concentraciones similares a las observadas en plasma durante el embarazo, sugiriendo que estas hormonas estimulan sobre los fibroblastos gingivales la producción de esta citoquina (Yokoyama et al., 2008).

En el presente estudio, IL-6 (cantidad y concentración) incrementaron progresivamente durante el embarazo y disminuyeron postparto, concomitante con el descenso en los niveles hormonales. Este hallazgo está de acuerdo con estudios previos que correlacionan los niveles de IL-6 con el estatus periodontal de la mujer. En pacientes con gingivitis crónica, los niveles de IL-6 en FCG resultaron elevados en comparación con el grupo de salud periodontal (Offenbacher et al., 2007). En un grupo de mujeres no embarazadas, se ha observado que los niveles de IL-6 fueron significativamente superiores en el grupo de mujeres con gingivitis en comparación con el grupo periodontalmente sano, aunque no se observaron diferencias a lo largo de las distintas fases del período menstrual en ninguno de los grupos (Becerik et al. 2010). Offenbacher et al. (2006) observó que en el caso de mujeres embarazadas con periodontitis no tratada, sufrieron un incremento significativo en los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en FCG. Por el contrario, el grupo que sí recibió tratamiento periodontal mejoró de forma significativa el estatus clínico. Otros estudios no han encontrado reducciones significativas de este bio-marcador de la inflamación, teniendo en cuenta que los niveles de IL-6 se midieron en suero (Michalowicz et al., 2009).

### **Factor de necrosis tumoral- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  sufrió una disminución en la producción (cantidad y concentración) a lo largo del embarazo e incrementó tras el parto. Los cambios fueron significativos para la reducción del tercer trimestre. Este hallazgo se corrobora con estudios previos que avalan un efecto inhibitorio de las hormonas sexuales sobre la regulación de TNF- $\alpha$  (Luo et al. 2010, Weitzman & Pacifici 2006, Cohen-Solal et al. 1993).

Las citoquinas anti-inflamatorias juegan un papel clave en la supervivencia a término del feto, contrarestando los efectos deletéreos de las citokinas Th-1 (Szekeres-Bartho, 2002). Sin embargo, estudios en animales han demostrado que la infección subcutánea inducida con *P. gingivalis* incrementa la producción materna de TNF- $\alpha$ , provocando efectos adversos sobre el embarazo (Collins et al., 1994, Lin et al., 2003). En relación a estudios clínicos, la información disponible respecto a la fluctuación

de TNF- $\alpha$  en función de las hormonas sexuales es muy reducida. En mujeres no embarazadas, no se observan cambios en los niveles de TNF- $\alpha$  a lo largo del ciclo menstrual (Baser et al., 2009). En suero, Hasegawa et al (2003) observaron que los niveles de TNF- $\alpha$  incrementaban en las localizaciones con profundidades de sondaje elevadas, mientras que en suero no observaron cambios en ninguno de los marcadores evaluados (proteína C-reactiva, PGE2, metaloproteinasa-9, fibrinógeno, endotoxina, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) tras realizar tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con periodontitis.

### **Prostaglandina E2**

Tras analizar la bibliografía, no hemos encontrado estudios publicados sobre los niveles de IL-1b y PGE2 en FCG de mujeres embarazadas sin periodontitis. A tenor de lo observado a través de estudios *in vitro*, en los cuales se observa que estradiol y progesterona estimulan la síntesis de PGE2 a nivel local (ElAttar and Hugoson, 1974) y sistémico (Miyagi et al., 1993), se propuso que el incremento de PGE2 durante el embarazo podría ser responsable del incremento de la inflamación gingival durante el embarazo (Sooriyamoorthy and Gower, 1989, Mascarenhas et al., 2003, Mealey and Moritz, 2003). En el presente estudio no se han observado cambios significativos en los niveles de PGE2 durante el embarazo, aunque los resultados deben evaluarse con precaución debido al reducido número de muestras analizadas, especialmente tras el parto. Basado en estos datos, se estimó que número de pacientes necesarios para poder detectar una diferencia de 24.87 pg/ml es de 2652 pacientes (cambios del primer al segundo trimestre,  $\alpha=0.05$  y potencia del estudio de 0.8).

## **ANÁLISIS CHAID EXHAUSTIVO**

La técnica de minería de datos (DM, *data mining*) engloba el conjunto de técnicas encaminadas a preparar, sondear y explorar bases de datos para la extracción del conocimiento procesable. El potencial predictivo del minaje de datos mediante algoritmos se ha convertido en una técnica común en la investigación médica (Khalil et al., Greco et al.). En relación a los cambios inflamatorios gingivales asociados al embarazo, no se han publicado con anterioridad modelos predictivos que analicen este aspecto.

El análisis CHAID-exhaustivo realizado mostró que la principal variable predictora del GI durante todo el embarazo y post-parto fue el índice de placa. La gingivitis del embarazo se describe como una condición gingival inflamatoria iniciada por placa y exacerbada por las hormonas sexuales esteroideas (Mariotti, 1999). Una cantidad mínima de placa bacteriana es indispensable, dado que se ha demostrado en las superficies que permanecen libre de placa no se desarrolla gingivitis del



embarazo (Arafat, 1974) o se reduce su incidencia al 0.03% (Chaikin, 1977). Esto implica que el embarazo en sí mismo no causa gingivitis, sino que agrava cuadros inflamatorios preexistentes.

Múltiples estudios han constatado que durante el embarazo se produce un incremento en la inflamación gingival sin cambios asociados en los niveles de placa (Silness and Loe, 1964, Cohen et al., 1969, Cohen et al., 1971, Hugoson, 1971, O'Neil, 1979b, Zaki et al., 1984, Tilakaratne et al., 2000). De esta manera, la placa bacteriana se convierte en un factor necesario, pero su papel etiológico queda reducido.

Para tratar de evaluar la relación entre el índice gingival y el índice de placa se han realizado varias aproximaciones. Silness & Loe (1964) analizaron el cociente GI/PII, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.73 durante el embarazo y 0.99 postparto, lo cual resta importancia al factor placa durante el embarazo y sugiere que otros factores están implicados en la inflamación gingival gestacional. Kinbby et al. (1996) describió la relación GI/PII (ratio G/P) como un incremento de la reactividad a la placa bacteriana, lo cual da más peso al papel de la placa. En nuestro estudio se observa que, sin intervención, los niveles de placa presentados durante el primer y segundo trimestres modularon la inflamación gingival durante el embarazo y postparto. Este hallazgo potencia la relación existente entre los depósitos bacterianos y la severidad de la gingivitis presentada, dado que en función de la cuantía de placa bacteriana se pudo estimar la inflamación gingival desarrollada.

Durante el segundo y tercer trimestres se produjo un incremento en la inflamación gingival. Siguiendo el modelo multivariante aplicado, este incremento pudo ser explicado en el 61.9% de los casos por cambios cualitativos en la composición del biofilm subgingival. Este grupo de pacientes corresponden al nivel intermedio de placa bacteriana (Nodo 2; PII 0.41-0.98). La segunda variable significativamente implicada en el GI fueron los recuentos de *P.gingivalis*. La ausencia de *P.gingivalis* se asoció a menor inflamación gingival, mientras que su presencia favoreció el desarrollo de formas más severas de gingivitis y explica las diferentes formas de presentación clínica entre las gestantes. La frecuencia de detección de *P.gingivalis* fue relativamente constante durante el embarazo (35.71-40.48%), y las proporciones en la microbiota en las pacientes positivas fue del 11.25-20.07% (Carrillo-de-Albornoz et al.), lo cual es semejante a los datos de población española con gingivitis (Lau et al., 2004). *P.gingivalis* es un patógeno periodontal de evidencia demostrada, debido a que se asocia a formas destructivas de enfermedad (Haffajee and Socransky, 1994, Takeuchi et al., 2001, van Winkelhoff et al., 2002), localizaciones que sufren pérdida de inserción progresiva (Grossi et al., 1995) y localizaciones recurrentes (Fujise et al., 2002).

Tras el parto, la placa bacteriana fue la variable principal en modular la inflamación gingival, de forma que cuanto mayor fue la acumulación de depósitos bacterianos, de mayor severidad fue la gingivitis presentada. Los recuentos de *P.micra* también se asociaron de forma significativa con la

inflamación gingival, aunque no pueden obtenerse conclusiones definitivas con esta variable debido al tamaño muestral de los nodos.

Ninguna otra de las 29 variables evaluadas en este modelo multivariante presentó asociación significativa con la inflamación gingival desarrollada durante el embarazo.

Teniendo en cuenta las limitaciones del presente estudio puede concluirse:

- Durante el embarazo se produjo un incremento de la inflamación gingival en las pacientes embarazadas, especialmente marcado en los sextantes anteriores.
- Los factores etiológicos gingivales principales en este estudio involucrados en la inflamación gingival durante el embarazo fueron la placa bacteriana y la presencia del patógeno *P.gingivalis*, sugiriendo que las variaciones cuantitativas y cualitativas del biofilm supra- y subgingival son capaces de modular la condición inflamatoria.
- Las variables inmunológicas analizadas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2) no estuvieron involucradas en la inflamación gingival de las pacientes gestantes.
- Son necesarios más estudios en esta línea de investigación, incrementando el número de variables evaluadas y estandarizando la metodología. Los posibles cambios vasculares locales y cambios celulares no han sido contemplados en este estudio.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abut, L. I., Apan, T., Otlı, B., Caliskan, A. & Durmaz, R. (2008) The characteristics of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children attending a daycare unit. *New Microbiol* **31**, 357-362.
- Acharya, S. & Bhat, P. V. (2009) Oral-health-related quality of life during pregnancy. *J Public Health Dent* **69**, 74-77.
- Adams, D., Carney, J. S. & Dicks, D. A. (1974) Pregnancy gingivitis: a survey of 100 antenatal patients. *J Dent* **2**, 106-110.
- Addy, M., Dummer, P. M., Hunter, M. L., Kingdon, A. & Shaw, W. C. (1987) A study of the association of fraenal attachment, lip coverage, and vestibular depth with plaque and gingivitis. *J Periodontol* **58**, 752-757.
- Adriaens, L. M., Alessandri, R., Sporri, S., Lang, N. P. & Persson, G. R. (2009) Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol* **80**, 72-81.
- Agirbasli, H., Bilgen, H., Ozcan, S. K., Otlı, B., Sinik, G., Cerikcioglu, N., Durmaz, R., Can, E., Yalman, N., Gedikoglu, G. & Sugita, T. (2008a) Two possible cases of *Trichosporon* infections in bone-marrow-transplanted children: the first case of *T. japonicum* isolated from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* **61**, 130-132.
- Agirbasli, H., Otlı, B., Bilgen, H., Durmaz, R. & Gedikoglu, G. (2008b) Epidemiological characteristics of fatal *Candida krusei* fungemia in immunocompromised febrile neutropenic children. *Infection* **36**, 88-91.
- Akalin, F. A., Baltacioglu, E., Alver, A. & Karabulut, E. (2009) Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in pregnant women with chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 457-467.
- Albandar, J. M., Buischi, Y. A. & Axelsson, P. (1995) Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol* **66**, 249-254.
- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* **39**, 509-513.
- Amar, S. & Chung, K. M. (1994) Influence of hormonal variation on the periodontium in women. *Periodontol 2000* **6**, 79-87.
- Arafat, A. H. (1974) Periodontal status during pregnancy. *J Periodontol* **45**, 641-643.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6. doi:10.1902/annals.1999.
- Atabay, H. I., Unver, A., Sahin, M., Otlı, S., Elmali, M. & Yaman, H. (2008) Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). *Vet Microbiol* **128**, 400-405.
- Aufdemorte, T. B. & Sheridan, P. J. (1981) Nuclear uptake of sex steroids in gingiva of the baboon. *J Periodontol* **52**, 430-434.
- Ay, S., Guldur, T., Tekerekoglu, M. S. & Otlı, B. [Investigation of hydrophobic characteristics of biofilm producer and non-producer *Staphylococcus aureus* clinical isolates]. *Mikrobiyol Bul* **44**, 221-230.
- Aycan, O. M., Otlı, G. H., Karaman, U., Daldal, N. & Atambay, M. (2007) [Frequency of the appearance of *Demodex* sp. in various patient and age groups]. *Turkiye Parazitolo Derg* **31**, 115-118.
- Bader, J. D., Rozier, R. G., McFall, W. T., Jr. & Ramsey, D. L. (1991) Effect of crown margins on periodontal conditions in regularly attending patients. *J Prosthet Dent* **65**, 75-79.
- Baser, U., Cekici, A., Tanrikulu-Kucuk, S., Kantarci, A., Ademoglu, E. & Yalcin, F. (2009) Gingival inflammation and interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during the menstrual cycle. *J Periodontol* **80**, 1983-1990.
- Becerik, S., Ozcaka, O., Nalbantsoy, A., Atilla, G., Celec, P., Behuliak, M. & Emingil, G. Effects of menstrual cycle on periodontal health and gingival crevicular fluid markers. *J Periodontol* **81**, 673-681.
- Bergmann, A. & Deinzer, R. (2008) Daytime variations of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid. *Eur J Oral Sci* **116**, 18-22.
- Bergmann, O. J., Ellegaard, B., Dahl, M. & Ellegaard, J. (1992) Gingival status during chemical plaque control with or without prior mechanical plaque removal in patients with acute myeloid leukaemia. *J Clin Periodontol* **19**, 169-173.

- Bergstrom, J., Persson, L. & Preber, H. (1988) Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Scand J Dent Res* **96**, 34-39.
- Bezirtzoglou, E., Voidarou, C., Papadaki, A., Tsiotsias, A., Kotsovolou, O. & Konstandi, M. (2008) Hormone therapy alters the composition of the vaginal microflora in ovariectomized rats. *Microb Ecol* **55**, 751-759.
- Boyd, R. L. & Baumrind, S. (1992) Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* **62**, 117-126.
- Brabin, B. J. (1985) Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev Infect Dis* **7**, 579-603.
- Breuer, M. M. & Cosgrove, R. S. (1989) The relationship between gingivitis and plaque levels. *J Periodontol* **60**, 172-175.
- Cappelli, D., Holt, S. C., Singer, R. E., Pickrum, H. M. & Ebersole, J. L. (2000) Effects of 0.12% chlorhexidine gluconate on experimental gingivitis in non-human primates: clinical and microbiological alterations. *Oral Dis* **6**, 124-131.
- Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D. & Bascones-Martinez, A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* **37**, 230-240.
- Cerna, H., Vesely, J., Nastoupilova, E., Lechner, J., Fingerova, H. & Pohanka, J. (1990) Periodontium and vitamin E and A in pregnancy. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* **125**, 173-179.
- Cetin, E. S., Durmaz, R., Tetik, T., Otlu, B., Kaya, S. & Caliskan, A. (2009) Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Infect Control* **37**, 56-64.
- Chaikin, B. S. (1977) Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence Int Dent Dig* **8**, 81-89.
- Chapple, I. L., Landini, G., Griffiths, G. S., Patel, N. C. & Ward, R. S. (1999) Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *J Periodontal Res* **34**, 79-86.
- Chatterton, R. T., Jr., Mateo, E. T., Hou, N., Rademaker, A. W., Acharya, S., Jordan, V. C. & Morrow, M. (2005) Characteristics of salivary profiles of oestradiol and progesterone in premenopausal women. *J Endocrinol* **186**, 77-84.
- Cheleuitte, D., Mizuno, S. & Glowacki, J. (1998) In vitro secretion of cytokines by human bone marrow: effects of age and estrogen status. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2043-2051.
- Chen, T. L., Aronow, L. & Feldman, D. (1977) Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* **100**, 619-628.
- Chung, C. H., Vanarsdall, R. L., Cavalcanti, E. A., Baldinger, J. S. & Lai, C. H. (2000) Comparison of microbial composition in the subgingival plaque of adult crowded versus non-crowded dental regions. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* **15**, 321-330.
- Ciantar, M. & Caruana, D. J. (1998) Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *J Periodontal Res* **33**, 259-264.
- Cohen, D. W., Friedman, L., Shapiro, J. & Kyle, G. C. (1969) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. *J Periodontol* **40**, 563-570.
- Cohen, D. W., Shapiro, J., Friedman, L., Kyle, G. C. & Franklin, S. (1971) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. II. *J Periodontol* **42**, 653-657.
- Cohen-Solal, M. E., Graulet, A. M., Denne, M. A., Gueris, J., Baylink, D. & de Vernejoul, M. C. (1993) Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 1648-1653.
- Collins, J. G., Windley, H. W., 3rd, Arnold, R. R. & Offenbacher, S. (1994) Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun* **62**, 4356-4361.
- Conde Vidal, J. M., Ingles Castello, M. & Roldan Gonzalez, P. (1981) [Periodontal disease during pregnancy]. *Rev Esp Estomatol* **29**, 179-190.
- Cortellini, P., Tonetti, M. S., Lang, N. P., Suvan, J. E., Zucchelli, G., Vangsted, T., Silvestri, M., Rossi, R., McClain, P., Fonzar, A., Dubravec, D. & Adriaens, P. (2001) The simplified papilla preservation flap in the regenerative treatment of deep intrabony defects: clinical outcomes and postoperative morbidity. *J Periodontol* **72**.
- Coskun, H. & Ozturk, B. (2000) Vitamin C contents of some herbs used in Van Herby cheese (Van Otlu Peyniri). *Nahrung* **44**, 379-380.

- Culhane, J. F., Rauh, V., McCollum, K. F., Hogan, V. K., Agnew, K. & Wadhwa, P. D. (2001) Maternal stress is associated with bacterial vaginosis in human pregnancy. *Matern Child Health J* **5**, 127-134.
- Cutler, C. W., Machen, R. L., Jotwani, R. & Iacopino, A. M. (1999) Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol* **70**, 1313-1321.
- Deinzer, R., Forster, P., Fuck, L., Herforth, A., Stiller-Winkler, R. & Idel, H. (1999) Increase of crevicular interleukin 1beta under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol* **26**, 1-8.
- Deinzer, R., Weik, U., Kolb-Bachofen, V. & Herforth, A. (2007) Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *J Periodontol Res* **42**, 318-324.
- Delaney, J. E. & Kornman, K. S. (1987) Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 71-76.
- Demirel, U., Harputluoglu, M. M., Seckin, Y., Ciralik, H., Temel, I., Ozyalin, F., Otlü, B., Bilgic, Y., Dincturk, M. S. & Aladag, H. An antibody of TNF-alpha did not prevent thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*.
- Durmaz, B., Durmaz, R., Otlü, B. & Sonmez, E. (2000) Nosocomial infections in a new medical center, Turkey. *Infect Control Hosp Epidemiol* **21**, 534-536.
- Durmaz, R., Otlü, B. & Direkel, S. (2002a) Effect of multiple freezing and thawing of serum on TT virus and hepatitis B virus DNA positivity. *Arch Virol* **147**, 515-518.
- Durmaz, R., Otlü, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., Aktas, E., Gursoy, N. C. & Caliskan, A. (2009) The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* **62**, 372-377.
- Durmaz, R., Ozerol, I. H., Kalcioğlu, M. T., Oncel, S., Otlü, B., Direkel, S. & Hendolin, P. H. (2002b) Detection of *Alloiococcus otitidis* in the nasopharynx and in the outer ear canal. *New Microbiol* **25**, 265-268.
- Dyer, R. F., Sodek, J. & Heersche, J. N. (1980) The effect of 17 beta-estradiol on collagen and noncollagenous protein synthesis in the uterus and some periodontal tissues. *Endocrinology* **107**, 1014-1021.
- el-Ashiry, G. M., el-Kafrawy, A. H., Nasr, M. F. & Younis, N. (1971) Gingival condition of Egyptian pregnant women. *J Periodontol* **42**, 271-272.
- ElAttar, T. M. (1976) Prostaglandin E2 in human gingiva in health and disease and its stimulation by female sex steroids. *Prostaglandins* **11**, 331-341.
- ElAttar, T. M. & Hugoson, A. (1974) Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *J Periodontol Res* **9**, 284-289.
- Emre, S., Otlü, B., Cankaya, C., Doganay, S. & Durmaz, R. (2007) Transfusion-transmitted virus DNA in serum, tear and aqueous humour of patients undergoing cataract operation. *Clin Experiment Ophthalmol* **35**, 759-762.
- Engbretson, S. P., Grbic, J. T., Singer, R. & Lamster, I. B. (2002) GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* **29**, 48-53.
- Eriksen, E. F., Colvard, D. S., Berg, N. J., Graham, M. L., Mann, K. G., Spelsberg, T. C. & Riggs, B. L. (1988) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* **241**, 84-86.
- Evereklioglu, C., Doganay, S., Er, H., Cekmen, M., Ozerol, E. & Otlü, B. (2003a) Serum leptin concentrations are decreased and correlated with disease severity in age-related macular degeneration: a preliminary study. *Eye (Lond)* **17**, 350-355.
- Evereklioglu, C., Er, H., Doganay, S., Cekmen, M., Turkoz, Y., Otlü, B. & Ozerol, E. (2003b) Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol* **106**, 129-136.
- Ferris, G. M. (1993) Alteration in female sex hormones: their effect on oral tissues and dental treatment. *Compendium* **14**, 1558-1564.

- Figuro, E., Carrillo-de-Albornoz, A., Herrera, D. & Bascones-Martinez, A. Gingival changes during pregnancy: I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters. *J Clin Periodontol* **37**, 220-229.
- Formicola, A. J., Weatherford, T., 3rd & Grupe, H., Jr. (1970) The uptake of H<sup>3</sup>-estradiol by the oral tissues of rats. *J Periodontal Res* **5**, 269-275.
- Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D. F. & Berglundh, T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **26**, 453-460.
- Fujise, O., Hamachi, T., Inoue, K., Miura, M. & Maeda, K. (2002) Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol* **73**, 1253-1259.
- Gann, P. H., Giovanazzi, S., Van Horn, L., Branning, A. & Chatterton, R. T., Jr. (2001) Saliva as a medium for investigating intra- and interindividual differences in sex hormone levels in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 59-64.
- Gibbons, R. J. & Macdonald, J. B. (1960) Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* **80**, 164-170.
- Glick, M., Pliskin, M. E. & Weiss, R. C. (1990) The clinical and histologic appearance of HIV-associated gingivitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **69**, 395-398.
- Goldstein, A. R. (1979) Enamel pearls as contributing factor in periodontal breakdown. *J Am Dent Assoc* **99**, 210-211.
- Golub, L. M. & Kleinberg, I. (1976) Gingival crevicular fluid: a new diagnostic aid in managing the periodontal patient. *Oral Sci Rev*, 49-61.
- Gonzales, J. R., Herrmann, J. M., Boedeker, R. H., Francz, P. I., Biesalski, H. & Meyle, J. (2001) Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **28**, 544-549.
- Gordon, C. M., LeBoff, M. S. & Glowacki, J. (2001) Adrenal and gonadal steroids inhibit IL-6 secretion by human marrow cells. *Cytokine* **16**, 178-186.
- Gornstein, R. A., Lapp, C. A., Bustos-Valdes, S. M. & Zamorano, P. (1999) Androgens modulate interleukin-6 production by gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* **70**, 604-609.
- Greco, R., Papalia, T., Lofaro, D., Maestripieri, S., Mancuso, D. & Bonofiglio, R. Decisional trees in renal transplant follow-up. *Transplant Proc* **42**, 1134-1136.
- Grossi, S. G., Genco, R. J., Machtei, E. E., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R., Zambon, J. J. & Hausmann, E. (1995) Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* **66**, 23-29.
- Guarnelli, M. E., Zangari, F., Manfrini, R., Scapoli, C. & Trombelli, L. (2004) Evaluation of additional amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinse during supportive therapy in patients with generalized aggressive periodontitis. A randomized, crossover, double-blind, controlled trial. *J Clin Periodontol* **31**, 742-748.
- Gul, M., Esrefoglu, M., Ozturk, F., Ates, B. & Otlu, A. (2009) The beneficial effects of pentoxifylline on caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* **54**, 555-563.
- Gulati, M. S., Grewal, N. & Kaur, A. (1998) A comparative study of effects of mouth breathing and normal breathing on gingival health in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* **16**, 72-83.
- Guncu, G. N., Tozum, T. F. & Caglayan, F. (2005) Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature. *Aust Dent J* **50**, 138-145.
- Gursoy, M., Haraldsson, G., Hyvonen, M., Sorsa, T., Pajukanta, R. & Kononen, E. (2009) Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol* **24**, 299-303.
- Gursoy, M., Kononen, E., Gursoy, U. K., Tervahartiala, T., Pajukanta, R. & Sorsa, T. Periodontal status and neutrophilic enzyme levels in gingival crevicular fluid during pregnancy and postpartum. *J Periodontol* **81**, 1790-1796.
- Gursoy, M., Kononen, E., Tervahartiala, T., Gursoy, U. K., Pajukanta, R. & Sorsa, T. Longitudinal study of salivary proteinases during pregnancy and postpartum. *J Periodontal Res* **45**, 496-503.
- Gursoy, M., Pajukanta, R., Sorsa, T. & Kononen, E. (2008) Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *J Clin Periodontol* **35**, 576-583.



- Gursoy, U. K., Kononen, E., Pradhan-Palikhe, P., Tervahartiala, T., Pussinen, P. J., Suominen-Taipale, L. & Sorsa, T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* **37**, 487-493.
- Gusberti, F. A., Mombelli, A., Lang, N. P. & Minder, C. E. (1990) Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* **17**, 685-692.
- Haas, A. N., Rosing, C. K., Oppermann, R. V., Albandar, J. M. & Susin, C. (2009) Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. *J Periodontol* **80**, 1380-1387.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 78-111.
- Hart, T. C. & Kornman, K. S. (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* **14**, 202-215.
- Hasegawa, K., Furuichi, Y., Shimotsu, A., Nakamura, M., Yoshinaga, M., Kamitomo, M., Hatae, M., Maruyama, I. & Izumi, Y. (2003) Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol* **74**, 1764-1770.
- Heasman, P. A., Collins, J. G. & Offenbacher, S. (1993) Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontol Res* **28**, 241-247.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & Leon, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* **35**, 106-113.
- Hoffman, B. B., Lavin, T. N., Lefkowitz, R. J. & Ruffolo, R. R., Jr. (1981) Alpha adrenergic receptor subtypes in rabbit uterus: mediation of myometrial contraction and regulation by estrogens. *J Pharmacol Exp Ther* **219**, 290-295.
- Holm-Pedersen, P. & Loe, H. (1967) Flow of gingival exudate as related to menstruation and pregnancy. *J Periodontol Res* **2**, 13-20.
- Hou, G. L. & Tsai, C. C. (1993) Relationship between palato-radicular grooves and localized periodontitis. *J Clin Periodontol* **20**, 678-682.
- Hugoson, A. (1970) Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation of pregnant women and experimental studies in dogs. *J Periodontol Res Suppl* **5**, 1-18.
- Hugoson, A. (1971) Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study. *Odontol Revy* **22**, 65-84.
- Ito, I., Hayashi, T., Yamada, K., Kuzuya, M., Naito, M. & Iguchi, A. (1995) Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. *Life Sci* **56**, 2247-2253.
- Jensen, J., Liljemark, W. & Bloomquist, C. (1981) The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol* **52**, 599-602.
- Johnson, T. C., Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Dyer, J. K. & Patil, K. D. (1997) Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodontol* **24**, 618-625.
- Jones, D. S., Irwin, C. R., Woolfson, A. D., Djokic, J. & Adams, V. (1999) Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. *J Pharm Sci* **88**, 592-598.
- Jonsson, D. (2007) The biological role of the female sex hormone estrogen in the periodontium--studies on human periodontal ligament cells. *Swed Dent J Suppl*, 11-54.
- Jonsson, R., Howland, B. E. & Bowden, G. H. (1988) Relationships between periodontal health, salivary steroids, and Bacteroides intermedius in males, pregnant and non-pregnant women. *J Dent Res* **67**, 1062-1069.
- Josefsson, E., Tarkowski, A. & Carlsten, H. (1992) Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell Immunol* **142**, 67-78.
- Kalcioglu, M. T., Oncel, S., Durmaz, R., Otlu, B., Miman, M. C. & Ozturan, O. (2002) Bacterial etiology of otitis media with effusion; focusing on the high positivity of Alloiooccus otitidis. *New Microbiol* **25**, 31-35.

- Kalkwarf, K. L. (1978) Effect of oral contraceptive therapy on gingival inflammation in humans. *J Periodontol* **49**, 560-563.
- Kamma, J., Mombelli, A., Tsinidou, K., Vasdekis, V. & Giannopoulou, C. (2009) Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 7-10.
- Karabiber, H., Sonmezgoz, E., Ozerol, E., Yakinci, C., Otlu, B. & Yologlu, S. (2003) Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid. *Brain Dev* **25**, 113-115.
- Karabulut, A. B., Gul, M., Karabulut, E., Kiran, T. R., Ocak, S. G. & Otlu, O. Oxidant and antioxidant activity in rabbit livers treated with zoledronic acid. *Transplant Proc* **42**, 3820-3822.
- Katz, A., Shapiro, S., Gedalia, I. & Zukerman, H. (1969) Periodontal condition and blood citrate level in pregnant women. *J Dent Res* **48**, 140-143.
- Kaufman, E. & Lamster, I. B. (2002) The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 197-212.
- Kawahara, K. & Shimazu, A. (2003) Expression and intracellular localization of progesterone receptors in cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* **38**, 242-246. doi:654 [pii].
- Kayabas, U., Bayraktar, M., Otlu, B., Ugras, M., Ersoy, Y., Bayindir, Y. & Durmaz, R. (2008) An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. *Am J Infect Control* **36**, 33-38.
- Khalil, P. N., Kleespies, A., Angele, M. K., Thasler, W. E., Siebeck, M., Bruns, C. J., Mutschler, W. & Kanz, K. G. The formal requirements of algorithms and their implications in clinical medicine and quality management. *Langenbecks Arch Surg* **396**, 31-40.
- Kinane, D. F., Winstanley, F. P., Adonogianaki, E. & Moughal, N. A. (1992) Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol* **37**, 153-156.
- Kinnby, B., Matsson, L. & Astedt, B. (1996) Aggravation of gingival inflammatory symptoms during pregnancy associated with the concentration of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in gingival fluid. *J Periodontal Res* **31**, 271-277.
- Klinger, G., Eick, S., Pfister, W., Graser, T., Moore, C. & Oettel, M. (1998) Influence of hormonal contraceptives on microbial flora of gingival sulcus. *Contraception* **57**, 381-384.
- Klinger, W. & Sommer, M. (1982) Aminoketone synthesis in rat liver: age dependence of basic activity and inducibility by allyl isopropyl acetamide. *Acta Biol Med Ger* **41**, 823-830.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res* **15**, 111-122.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melanogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* **35**, 256-263.
- Kraivaphan, P., Amornchat, C. & Triratana, T. (2007) Effects of a triclosan dentifrice on plaque formation, gingivitis and gingival bleeding in pregnant women: five-month clinical results. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **38**, 594-597.
- Kraivaphan, P., Amornchat, C., Triratana, T. & Leethochawalit, U. (2006) Clinical effect of a triclosan containing dentifrice on gingivitis during pregnancy and post-partum. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **37**, 820-825.
- Kurus, M., Esrefoglu, M., Karabulut, A. B., Sogutlu, G., Kaya, M. & Otlu, A. (2008) Oral L-arginine protects against cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* **60**, 411-419.
- Kurus, M., Firat, Y., Cetin, A., Kelles, M. & Otlu, A. (2009a) The effect of resveratrol in tracheal tissue of rats exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol* **21**, 979-984.
- Kurus, M., Ugras, M., Ates, B. & Otlu, A. (2009b) Apricot ameliorates alcohol induced testicular damage in rat model. *Food Chem Toxicol* **47**, 2666-2672.
- Kuzucu, C., Durmaz, R., Otlu, B., Aktas, E., Gulcan, H. & Cizmeci, Z. (2008) Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiol* **31**, 401-408.
- Laine, M. A. (2002) Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand* **60**, 257-264.
- Lamster, I. B., Hartley, L. J. & Vogel, R. I. (1985) Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and

- ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *J Periodontol* **56**, 13-21.
- Lanciers, S., Despinasse, B., Mehta, D. I. & Blecker, U. (1999) Increased susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**, 195-198.
- Lang, N. P., Kiel, R. A. & Anderhalden, K. (1983) Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* **10**, 563-578.
- Lang, N. P., Schatzle, M. A. & Loe, H. (2009) Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* **36 Suppl 10**, 3-8.
- Lang, N. P., Tonetti, M. S., Suter, J., Sorrell, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000) Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontol Res* **35**, 102-107.
- Lapp, C. A. & Lapp, D. F. (2005) Analysis of interleukin-activated human gingival fibroblasts: modulation of chemokine responses by female hormones. *J Periodontol* **76**, 803-812. doi:10.1902/jop.2005.76.5.803 [doi].
- Lapp, C. A., Lohse, J. E., Lewis, J. B., Dickinson, D. P., Billman, M., Hanes, P. J. & Lapp, D. F. (2003) The effects of progesterone on matrix metalloproteinases in cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* **74**, 277-288.
- Lapp, C. A., Thomas, M. E. & Lewis, J. B. (1995) Modulation by progesterone of interleukin-6 production by gingival fibroblasts. *J Periodontol* **66**, 279-284.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C. & Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* **31**, 11-18.
- Leggott, P. J., Robertson, P. B., Jacob, R. A., Zambon, J. J., Walsh, M. & Armitage, G. C. (1991) Effects of ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health and subgingival microflora in humans. *J Dent Res* **70**, 1531-1536.
- Lie, M. A., Danser, M. M., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., de Graaff, J. & van der Velden, U. (1995) Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **22**, 642-647.
- Lie, M. A., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Loos, B. G., van Steenberghe, T. J. & van der Velden, U. (1998) Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* **25**, 677-686.
- Lieff, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Jared, H., Madianos, P. N., Moss, K., Beck, J. & Offenbacher, S. (2004) The oral conditions and pregnancy study: periodontal status of a cohort of pregnant women. *J Periodontol* **75**, 116-126.
- Lin, D., Smith, M. A., Champagne, C., Elter, J., Beck, J. & Offenbacher, S. (2003) *Porphyromonas gingivalis* infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect Immun* **71**, 5156-5162.
- Lindhe, J. & Attstrom, R. (1967) Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontol Res* **2**, 194-198.
- Lindhe, J., Attstrom, R. & Bjorn, A. L. (1969) The influence of progestogen on gingival exudation during menstrual cycles. A longitudinal study. *J Periodontol Res* **4**, 97-102.
- Lindhe, J., Birch, J. & Branemark, P. I. (1968) Wound healing in estrogen treated female rabbits. *J Periodontol Res* **3**, 21-23.
- Lindhe, J. & Branemark, P. I. (1967a) Changes in microcirculation after local application of sex hormones. *J Periodontol Res* **2**, 185-193.
- Lindhe, J. & Branemark, P. I. (1967b) Changes in vascular permeability after local application of sex hormones. *J Periodontol Res* **2**, 259-265.
- Lindhe, J. & Branemark, P. I. (1968) The effects of sex hormones on vascularization of granulation tissue. *J Periodontol Res* **3**, 6-11.
- Lindhe, J., Branemark, P. I. & Lundskog, J. (1967) Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones. *J Periodontol Res* **2**, 266-272.

- Lindhe, J. & Nyman, S. (1975) The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol* **2**, 67-79.
- Lipson, S. F. & Ellison, P. T. (1992) Normative study of age variation in salivary progesterone profiles. *J Biosoc Sci* **24**, 233-244.
- Listgarten, M. A. (1980) Periodontal probing: what does it mean? *J Clin Periodontol* **7**, 165-176.
- Listgarten, M. A., Lindhe, J. & Parodi, R. (1979) The effect of systemic antimicrobial therapy on plaque and gingivitis in dogs. *J Periodontal Res* **14**, 65-75.
- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* **13**, 431-445.
- Loe, H. & Silness, J. (1963) PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. I. PREVALENCE AND SEVERITY. *Acta Odontol Scand* **21**, 533-551.
- Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J Periodontol* **36**, 177-187.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, S. B. & Schiott, C. R. (1967) Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res* **2**, 282-289.
- Lopatin, D. E., Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980) Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy. *Infect Immun* **28**, 713-718.
- Lundgren, D. & Lindhe, J. (1971) Lack of influence of female sex hormones on alveolar bone loss in hamsters. *Scand J Dent Res* **79**, 113-118.
- Lundgren, D., Magnusson, B. & Lindhe, J. (1973) Connective tissue alterations in gingivae of rats treated with estrogen and progesterone. A histologic and autoradiographic study. *Odontol Revy* **24**, 49-58.
- Luo, G., Abrahams, V. M., Tadesse, S., Funai, E. F., Hodgson, E. J., Gao, J. & Norwitz, E. R. Progesterone inhibits basal and TNF-alpha-induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth. *Reprod Sci* **17**, 532-539. doi:1933719110363618 [pii]  
10.1177/1933719110363618 [doi].
- Machuca, G., Khoshfeiz, O., Lacalle, J. R., Machuca, C. & Bullon, P. (1999) The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *J Periodontol* **70**, 779-785. doi:10.1902/jop.1999.70.7.779 [doi].
- Magness, R. R., Sullivan, J. A., Li, Y., Phernetton, T. M. & Bird, I. M. (2001) Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1692-1698.
- Mariotti, A. (1994) Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med* **5**, 27-53.
- Mariotti, A. (1999) Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* **4**, 7-19. doi:10.1902/annals.1999.4.1.7 [doi].
- Mariotti, A. J. (2005) Estrogen and extracellular matrix influence human gingival fibroblast proliferation and protein production. *J Periodontol* **76**, 1391-1397. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1391 [doi].
- Markitziu, A., Zafiropoulos, G., Flores de Jacoby, L. & Pisanty, S. (1990) Periodontal alterations in patients with pemphigus vulgaris taking steroids. A biannual assessment. *J Clin Periodontol* **17**, 228-232.
- Markou, E., Eleana, B., Lazaros, T. & Antonios, K. (2009) The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. *Open Dent J* **3**, 114-119. doi:10.2174/1874210600903010114 [doi].
- Marsh, P. D., Moter, A. & Devine, D. A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000* **55**, 16-35. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x [doi].
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K. & Wang, H. L. (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol* **30**, 671-681. doi:055 [pii].
- Mealey, B. L. & Moritz, A. J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000* **32**, 59-81. doi:3206 [pii].

- Mellor, A. L. & Munn, D. H. (2000) Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol* **18**, 367-391. doi:18/1/367 [pii]  
10.1146/annurev.immunol.18.1.367 [doi].
- Meulenberg, P. M. & Hofman, J. A. (1989) Salivary progesterone excellently reflects free and total progesterone in plasma during pregnancy. *Clin Chem* **35**, 168-172.
- Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E., Califano, J. V., Burmeister, J. A. & Schenkein, H. A. (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* **71**, 1699-1707. doi:10.1902/jop.2000.71.11.1699 [doi].
- Michalowicz, B. S., Novak, M. J., Hodges, J. S., DiAngelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. N., Mitchell, D. A., Ferguson, J. E., Lupo, V., Bofill, J., Matseoane, S., Steffen, M. & Ebersole, J. L. (2009) Serum inflammatory mediators in pregnancy: changes after periodontal treatment and association with pregnancy outcomes. *J Periodontol* **80**, 1731-1741. doi:10.1902/jop.2009.090236 [doi].
- Miyagi, M., Morishita, M. & Iwamoto, Y. (1993) Effects of sex hormones on production of prostaglandin E<sub>2</sub> by human peripheral monocytes. *J Periodontol* **64**, 1075-1078.
- Miyazaki, H., Yamashita, Y., Shirahama, R., Goto-Kimura, K., Shimada, N., Sogame, A. & Takehara, T. (1991) Periodontal condition of pregnant women assessed by CPITN. *J Clin Periodontol* **18**, 751-754.
- Mombelli, A., Gusberti, F. A. & Lang, N. P. (1989a) Treatment of recurrent periodontal disease by root planing and Ornidazole (Tiberal). Clinical and microbiological findings. *J Clin Periodontol* **16**, 38-45.
- Mombelli, A., Gusberti, F. A., van Oosten, M. A. & Lang, N. P. (1989b) Gingival health and gingivitis development during puberty. A 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* **16**, 451-456.
- Mombelli, A., Lang, N. P., Burgin, W. B. & Gusberti, F. A. (1990) Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *J Periodontol Res* **25**, 331-338.
- Mombelli, A., Minder, C. E., Gusberti, F. A. & Lang, N. P. (1989c) Reproducibility of microscopic and cultural data in repeated subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* **16**, 434-442.
- Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Good, I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1982) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun* **38**, 651-667.
- Morishita, M., Aoyama, H., Tokumoto, K. & Iwamoto, Y. (1988) The concentration of salivary steroid hormones and the prevalence of gingivitis at puberty. *Adv Dent Res* **2**, 397-400.
- Morishita, M., Miyagi, M. & Iwamoto, Y. (1999a) Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* **70**, 757-760. doi:10.1902/jop.1999.70.7.757 [doi].
- Morishita, M., Shimazu, A. & Iwamoto, Y. (1999b) Analysis of oestrogen receptor mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* **44**, 781-783. doi:S0003-9969(99)00063-1 [pii].
- Mulholland, S. G., Qureshi, S. M., Fritz, R. W. & Silverman, H. (1982) Effect of hormonal deprivation on the bladder defense mechanism. *J Urol* **127**, 1010-1013.
- Muramatsu, Y. & Takaesu, Y. (1994) Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull Tokyo Dent Coll* **35**, 139-151.
- Nakagawa, S., Fujii, H., Machida, Y. & Okuda, K. (1994) A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis. Correlation between the occurrence of *Prevotella intermedia* and sex hormones. *J Clin Periodontol* **21**, 658-665.
- Nery, E. B., Edson, R. G., Lee, K. K., Pruthi, V. K. & Watson, J. (1995) Prevalence of nifedipine-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* **66**, 572-578.
- Ngan, P., Saito, S., Saito, M., Lanese, R., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. (1990) The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 beta on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro: comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* **35**, 717-725. doi:0003-9969(90)90094-Q [pii].

- O'Neil, T. C. (1979a) Maternal T-lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* **50**, 178-184.
- O'Neil, T. C. (1979b) Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* **50**, 279-282.
- Offenbacher, S., Barros, S. P., Singer, R. E., Moss, K., Williams, R. C. & Beck, J. D. (2007) Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol* **78**, 1911-1925. doi:10.1902/jop.2007.060465 [doi].
- Offenbacher, S., Lin, D., Strauss, R., McKaig, R., Irving, J., Barros, S. P., Moss, K., Barrow, D. A., Hefti, A. & Beck, J. D. (2006) Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* **77**, 2011-2024. doi:10.1902/jop.2006.060047 [doi].
- Otlu, B., Durmaz, R., Gunal, S., Sola, C., Zozio, T. & Rastogi, N. (2009a) Beijing/W and major spoligotype families of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. *New Microbiol* **32**, 255-263.
- Otlu, B., Emre, S., Turkcuoglu, P., Doganay, S. & Durmaz, R. (2009b) Investigation of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNAs in pterygium tissue. *Eur J Ophthalmol* **19**, 175-179.
- Otlu, S., Sahin, M. & Genc, O. (2002) Occurrence of anthrax in Kars district, Turkey. *Acta Vet Hung* **50**, 17-20. doi:10.1556/AVet.50.2002.1.3 [doi].
- Ozerol, I. H., Bayraktar, M. R., Iseri, L., Otlu, B. & Durmaz, R. (2005) The prevalence and molecular typing of enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from diarrheic stools in Malatya, Turkey. *New Microbiol* **28**, 237-243.
- Ozturk, F., Gul, M., Ates, B., Ozturk, I. C., Cetin, A., Vardi, N., Otlu, A. & Yilmaz, I. (2009) Protective effect of apricot (Prunus armeniaca L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Br J Nutr* **102**, 1767-1775. doi:S0007114509991322 [pii] 10.1017/S0007114509991322 [doi].
- Pack, A. R. & Thomson, M. E. (1980) Effects of topical and systemic folic acid supplementation on gingivitis in pregnancy. *J Clin Periodontol* **7**, 402-414.
- Parkar, M. H., Newman, H. N. & Olsen, I. (1996) Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Arch Oral Biol* **41**, 979-983. doi:S0003-9969(96)00053-2 [pii].
- Parlakpınar, H., Olmez, E., Acet, A., Ozturk, F., Tasdemir, S., Ates, B., Gul, M. & Otlu, A. (2009) Beneficial effects of apricot-feeding on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol* **47**, 802-808. doi:S0278-6915(09)00024-6 [pii].
- Persson, G. R., Hitti, J., Paul, K., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M. & Persson, R. E. (2008) Tannerella forsythia and Pseudomonas aeruginosa in subgingival bacterial samples from parous women. *J Periodontol* **79**, 508-516. doi:10.1902/jop.2008.070350 [doi].
- Persson, R., Hitti, J., Verhelst, R., Vaneechoutte, M., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M., Temmerman, M., Paul, K. & Eschenbach, D. (2009) The vaginal microflora in relation to gingivitis. *BMC Infect Dis* **9**, 6. doi:1471-2334-9-6 [pii] 10.1186/1471-2334-9-6 [doi].
- Piccinni, M. P. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J Reprod Immunol* **85**, 71-75. doi:S0165-0378(10)00041-0 [pii] 10.1016/j.jri.2010.01.006 [doi].
- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I. & Hourii-Haddad, Y. (2009) Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* **36**, 406-410. doi:CPE1393 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2009.01393.x [doi].
- Polan, M. L., Kuo, A., Loukides, J. & Bottomly, K. (1990) Cultured human luteal peripheral monocytes secrete increased levels of interleukin-1. *J Clin Endocrinol Metab* **70**, 480-484.
- Polson, A. M. (1977) Periodontal destruction associated with vertical root fracture. *J Periodontol* **48**, 27-32.
- Preshaw, P. M., Knutsen, M. A. & Mariotti, A. (2001) Experimental gingivitis in women using oral contraceptives. *J Dent Res* **80**, 2011-2015.

- Priddy, K. D. (1997) Immunologic adaptations during pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **26**, 388-394.
- Raber-Durlacher, J. E., Leene, W., Palmer-Bouva, C. C., Raber, J. & Abraham-Inpijn, L. (1993) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: immunohistochemical aspects. *J Periodontol* **64**, 211-218.
- Raber-Durlacher, J. E., van Steenberghe, T. J., Van der Velden, U., de Graaff, J. & Abraham-Inpijn, L. (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol* **21**, 549-558.
- Raber-Durlacher, J. E., Zeijlemaker, W. P., Meinesz, A. A. & Abraham-Inpijn, L. (1991) CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferative responses during experimental gingivitis in pregnancy and post-partum. *J Periodontol* **62**, 663-667.
- Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Maze, C. A., Patil, K. D., Gallagher, S. J. & Mattson, J. S. (1999) Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* **70**, 823-828. doi:10.1902/jop.1999.70.8.823 [doi].
- Ren, L., Jiang, Z. Q., Fu, Y., Leung, W. K. & Jin, L. (2009) The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* **36**, 619-626. doi:CPE1436 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2009.01436.x [doi].
- Reuland-Bosma, W., Liem, R. S., Jansen, H. W., van Dijk, L. J. & van der Weele, L. T. (1988) Morphological aspects of the gingiva in children with Down's syndrome during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **15**, 293-302.
- Rylander, H., Attstrom, R. & Lindhe, J. (1975) Influence of experimental neutropenia in dogs with chronic gingivitis. *J Periodontal Res* **10**, 315-323.
- Sahin, M., Atabay, H. I., Bicakci, Z., Unver, A. & Otlu, S. (2007) Outbreaks of tularemia in Turkey. *Kobe J Med Sci* **53**, 37-42.
- Sahin, M., Genc, O., Unver, A. & Otlu, S. (2008) Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod* **40**, 281-286.
- Salum, F. G., Yurgel, L. S., Cherubini, K., De Figueiredo, M. A., Medeiros, I. C. & Nicola, F. S. (2008) Pyogenic granuloma, peripheral giant cell granuloma and peripheral ossifying fibroma: retrospective analysis of 138 cases. *Minerva Stomatol* **57**, 227-232.
- Samant, A., Malik, C. P., Chabra, S. K. & Devi, P. K. (1976) Gingivitis and periodontal disease in pregnancy. *J Periodontol* **47**, 415-418.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* **31**, 1034-1047.
- Sanz, M., Teughels, W. & Group, A. o. E. W. o. P. (2008) Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **35**, 3-7.

- 10.1111/j.1600-051X.2008.01256.x [doi].
- Sarlati, F., Akhondi, N. & Jahanbakhsh, N. (2004) Effect of general health and sociocultural variables on periodontal status of pregnant women. *J Int Acad Periodontol* **6**, 95-100.
- Sayin, T. C., Serper, A., Cehreli, Z. C. & Otlu, H. G. (2007) The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **104**, 418-424. doi:S1079-2104(07)00277-6 [pii]
- 10.1016/j.tripleo.2007.03.021 [doi].
- Scapoli, C., Mamolini, E. & Trombelli, L. (2007) Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* **34**, 1031-1038. doi:CPE1145 [pii]
- 10.1111/j.1600-051X.2007.01145.x [doi].
- Scapoli, C., Tatakis, D. N., Mamolini, E. & Trombelli, L. (2005) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *J Periodontol* **76**, 49-56. doi:10.1902/jop.2005.76.1.49 [doi].
- Seymour, R. A. (1993) Drug-induced gingival overgrowth. *Adverse Drug React Toxicol Rev* **12**, 215-232.
- Seymour, R. A. & Jacobs, D. J. (1992) Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol* **19**, 1-11.
- Shah, H. N. & Collins, D. M. (1990) Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 205-208.
- Shiau, H. J. & Reynolds, M. A. Sex differences in destructive periodontal disease: exploring the biologic basis. *J Periodontol* **81**, 1505-1517. doi:10.1902/jop.2010.100045 [doi].
- Silness, J. & Loe, H. (1964) PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. II. CORRELATION BETWEEN ORAL HYGIENE AND PERIODONTAL CONDITON. *Acta Odontol Scand* **22**, 121-135.
- Silness, J. & Loe, H. (1966) Periodontal disease in pregnancy. 3. Response to local treatment. *Acta Odontol Scand* **24**, 747-759.
- Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Aguillon, J. C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R. & Gamonal, J. (2008) Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol* **35**, 206-214. doi:CPE1190 [pii]
- 10.1111/j.1600-051X.2007.01190.x [doi].
- Smith, J. L. (1999) Foodborne infections during pregnancy. *J Food Prot* **62**, 818-829.
- Smukler, H. & Machtei, E. (1987) Gingival recession and plaque control. *Compendium* **8**, 194-198.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* **63**, 322-331.
- Sooriyamoorthy, M. & Gower, D. B. (1989) Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* **16**, 201-208.
- Stroup, D. F., Berlin, J. A., Morton, S. C., Olkin, I., Williamson, G. D., Rennie, D., Moher, D., Becker, B. J., Sipe, T. A. & Thacker, S. B. (2000) Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* **283**, 2008-2012. doi:jst00003 [pii].
- Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* **24**, 638-644.
- Szekeres-Bartho, J. (2002) Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* **21**, 471-495.
- Taani, D. Q., Habashneh, R., Hammad, M. M. & Baticha, A. (2003) The periodontal status of pregnant women and its relationship with socio-demographic and clinical variables. *J Oral Rehabil* **30**, 440-445. doi:1058 [pii].
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2001) Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity



- of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* **72**, 1354-1363. doi:10.1902/jop.2001.72.10.1354 [doi].
- Tallon, D. F., Gosling, J. P., Buckley, P. M., Dooley, M. M., Cleere, W. F., O'Dwyer, E. M. & Fottrell, P. F. (1984) Direct solid-phase enzyme immunoassay of progesterone in saliva. *Clin Chem* **30**, 1507-1511.
- Tang, X., Meng, H., Han, J., Zhang, L., Hou, J. & Zhang, F. (2008) Up-regulation of estrogen receptor-beta expression during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* **43**, 311-321. doi:JRE1031 [pii]  
10.1111/j.1600-0765.2007.01031.x [doi].
- Tatakis, D. N. & Trombelli, L. (1999) Adverse effects associated with a bioabsorbable guided tissue regeneration device in the treatment of human gingival recession defects. A clinicopathologic case report. *J Periodontol* **70**, 542-547. doi:10.1902/jop.1999.70.5.542 [doi].
- Tatakis, D. N. & Trombelli, L. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol* **31**, 229-238. doi:10.1111/j.1600-051x.2004.00477.x [doi]  
CPE477 [pii].
- Tekerekoglu, M. S., Ay, S., Otlu, B., Cicek, A., Kayabas, U. & Durmaz, R. (2007) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens of patients with nosocomial infection: are there unnoticed silent outbreaks? *New Microbiol* **30**, 131-137.
- Telleria, C. M., Ou, J., Sugino, N., Ferguson, S. & Gibori, G. (1998) The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology* **139**, 3597-3605.
- Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. & Loe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontol Res* **1**, 1-13.
- Thomson, M. E. & Pack, A. R. (1982) Effects of extended systemic and topical folate supplementation on gingivitis of pregnancy. *J Clin Periodontol* **9**, 275-280.
- Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A. W., Corea, S. M., Ekanayake, S. L. & de Silva, M. (2000) Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol* **27**, 787-792.
- Tipton, D. A., Howell, K. J. & Dabbous, M. K. (1997) Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol* **68**, 524-530.
- Tonetti, M. S., Cortellini, P., Lang, N. P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Rasperini, G., Rossi, R., Silvestri, M., Topoll, H., Wallkamm, B. & Zyburtz, M. (2004) Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **31**, 770-776. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00562.x [doi]  
CPE562 [pii].
- Tonetti, M. S., Cortellini, P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Baldi, C., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Magnani, C., Muller-Campanile, V., Patroni, S., Sanz, M., Vangsted, T., Zabalegui, I., Pini Prato, G. & Lang, N. P. (1998) Generalizability of the added benefits of guided tissue regeneration in the treatment of deep intrabony defects. Evaluation in a multicenter randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* **69**, 1183-1192.
- Tonetti, M. S., Lang, N. P., Cortellini, P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Mayfield, L., Rossi, R., Silvestri, M., Tiedemann, C., Topoll, H., Vangsted, T. & Wallkamm, B. (2002) Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol* **29**, 317-325. doi:cpe290407 [pii].
- Trombelli, L. (2004) Susceptibility to gingivitis: a way to predict periodontal disease? *Oral Health Prev Dent* **2 Suppl 1**, 265-269.
- Trombelli, L., Bottega, S., Orlandini, E., Scapoli, C., Tosi, M. & Tatakis, D. (2003) Response to a plaque control regimen on different levels of gingival inflammation. *Minerva Stomatol* **52**, 75-79.

- Trombelli, L., Farina, R., Manfrini, R. & Tatakis, D. N. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effect of incisor crown form. *J Dent Res* **83**, 728-731. doi:83/9/728 [pii].
- Trombelli, L., Farina, R., Minenna, L., Carrieri, A., Scapoli, C. & Tatakis, D. N. (2008) Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *J Clin Periodontol* **35**, 955-960. doi:CPE1315 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2008.01315.x [doi].
- Trombelli, L., Scapoli, C., Tatakis, D. N. & Minenna, L. (2006) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: response in aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **33**, 79-85. doi:CPE873 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2005.00873.x [doi].
- Trott, J. R. & Banoczy, J. (1962) The oral mucosa and keratinization. *Acta Morphol Acad Sci Hung* **11**, 217-228.
- Tsalikis, L., Parapanisiou, E., Bata-Kyrkou, A., Polymenides, Z. & Konstantinidis, A. (2002) Crevicular fluid levels of interleukin-1alpha and interleukin-1beta during experimental gingivitis in young and old adults. *J Int Acad Periodontol* **4**, 5-11.
- Uematsu, S., Mogi, M. & Deguchi, T. (1996) Increase of transforming growth factor-beta 1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* **41**, 1091-1095. doi:S0003-9969(96)00063-5 [pii].
- Ugras, M. Y., Kurus, M., Ates, B., Soylemez, H., Otlu, A. & Yilmaz, I. *Prunus armeniaca* L (apricot) protects rat testes from detrimental effects of low-dose x-rays. *Nutr Res* **30**, 200-208. doi:S0271-5317(10)00038-2 [pii] 10.1016/j.nutres.2010.03.001 [doi].
- UstUn, Y., Engin-UstUn, Y., Ozkaplan, E., Otlu, B. & Sait TekerekoGlu, M. Association of *Helicobacter pylori* infection with systemic inflammation in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* **23**, 311-314. doi:10.3109/14767050903121456 [doi].
- Van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Danser, M. M., Nijboer, A., Saxton, C. A. & Van der Velden, U. (1994) Effect of pre-experimental maintenance care duration on the development of gingivitis in a partial mouth experimental gingivitis model. *J Periodontol Res* **29**, 168-173.
- van Oosten, M. A., Mombelli, A., Gusberti, F. A. & Lang, N. P. (1988) Black-pigmented *Bacteroides* and spirochetes in the subgingival microbiota of prepubertal schoolchildren. *J Periodontol Res* **23**, 199-203.
- van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A. & van der Velden, U. (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* **29**, 1023-1028. doi:cpe291107 [pii].
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A. & Otlu, A. (2009) Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* **92**, 2028-2033. doi:S0015-0282(08)03912-5 [pii] 10.1016/j.fertnstert.2008.09.015 [doi].
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ozturk, F., Ates, B., Gul, M., Cetin, A., Erdogan, A. & Otlu, A. (2008) Potent protective effect of apricot and beta-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* **46**, 3015-3022. doi:S0278-6915(08)00286-X [pii] 10.1016/j.fct.2008.05.039 [doi].
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* **36**, 823-829. doi:CPE1462 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2009.01462.x [doi].
- Vitteck, J., Hernandez, M. R., Wenk, E. J., Rappaport, S. C. & Southren, A. L. (1982) Specific estrogen receptors in human gingiva. *J Clin Endocrinol Metab* **54**, 608-612.
- von Elm, E., Altman, D. G., Egger, M., Pocock, S. J., Gøtzsche, P. C., Vandenbroucke, J. P. & Initiative, S. (2008) The Strengthening the Reporting of Observational Studies in

- Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* **61**, 344-349. doi:S0895-4356(07)00436-2 [pii]  
10.1016/j.jclinepi.2007.11.008 [doi].
- Waerhaug, J. (1975) Presence or absence of plaque on subgingival restorations. *Scand J Dent Res* **83**, 193-201.
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. & Mosmann, T. R. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* **14**, 353-356.
- Wiedemann, W., Ketterle, A. & Naujoks, R. (1979) [Dental studies on the protective effect of breast feeding]. *Dtsch Zahnarzt Z* **34**, 427-429.
- Willershausen-Zonnchen, B., Lemmen, C. & Hamm, G. (1991) Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* **18**, 190-195.
- Wojcicki, C. J., Harper, D. S. & Robinson, P. J. (1987) Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and postpubertal children. *J Periodontol* **58**, 219-223.
- Yakupogullari, Y., Otlı, B., Dogukan, M., Gursöy, C., Korkmaz, E., Kizirgil, A., Özden, M. & Durmaz, R. (2008) Investigation of a nosocomial outbreak by alginate-producing pan-antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control* **36**, e13-18. doi:S0196-6553(08)00747-5 [pii]  
10.1016/j.ajic.2008.07.006 [doi].
- Yalcin, F., Basegmez, C., Isik, G., Berber, L., Eskinazi, E., Soyđinc, M., Issever, H. & Onan, U. (2002a) The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E2 concentrations and clinical parameters in pregnancy. *J Periodontol* **73**, 173-177. doi:10.1902/jop.2002.73.2.173 [doi].
- Yalcin, F., Eskinazi, E., Soyđinc, M., Basegmez, C., Issever, H., Isik, G., Berber, L., Has, R., Sabuncu, H. & Onan, U. (2002b) The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy. *J Periodontol* **73**, 178-182. doi:10.1902/jop.2002.73.2.178 [doi].
- Yanover, L. & Ellen, R. P. (1986) A clinical and microbiologic examination of gingival disease in parapubescent females. *J Periodontol* **57**, 562-567.
- Yetkin, G., Otlı, B., Cicek, A., Kuzucu, C. & Durmaz, R. (2006) Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Am J Infect Control* **34**, 188-192. doi:S0196-6553(06)00076-9 [pii]  
10.1016/j.ajic.2005.11.010 [doi].
- Yeung, A. L., Lo, E. C., Chow, T. W. & Clark, R. K. (2000) Oral health status of patients 5-6 years after placement of cobalt-chromium removable partial dentures. *J Oral Rehabil* **27**, 183-189.
- Yokoyama, M., Hinode, D., Yoshioka, M., Fukui, M., Tanabe, S., Grenier, D. & Ito, H. O. (2008) Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 55-59. doi:OMI391 [pii]  
10.1111/j.1399-302X.2007.00391.x [doi].
- Yuan, K. & Lin, M. T. (2004) The roles of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in the regression of pregnancy pyogenic granuloma. *Oral Dis* **10**, 179-185. doi:10.1046/j.1601-0825.2003.00997.x [doi]  
ODI997 [pii].
- Yucel, O. O., Berker, E., Gariboglu, S. & Otlı, H. (2008) Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **35**, 365-370. doi:CPE1212 [pii]  
10.1111/j.1600-051X.2008.01212.x [doi].
- Zachariasen, R. D. (1993) The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women Health* **20**, 21-30.
- Zaki, K., el Hak, R., Amer, W., Saleh, F., El Faras, A., Ragab, L. & Nour, H. (1984) Salivary female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Biomed Biochim Acta* **43**, 749-754.